Nachweis aromatischer Nitrogruppen über die Hydroxylaminstufe

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Astrid-Silvia Beinroth
aus Celle

1980

Nachweis aromatischer Nitrogruppen über die Hydroxylaminstufe

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Astrid-Silvia Beinroth
aus Celle

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 1980
Dekan: Prof. Dr. M. Hanack
1.Berichterstatter: Prof. Dr. H. Auterhoff
2.Berichterstatter: Prof. Dr. K.-A. Kovar

Die vorliegende Arbeit wurde im Oktober 1977
unter Anleitung von Herrn Professor Dr.H.Auterhoff
am Pharmazeutischen Institut der Universität
Tübingen begonnen und im April 1980 abgeschlossen.

Meinem verehrten Lehrer
Herrn Professor Dr.H.Auterhoff
danke ich für die Anregungen und
die freundliche Unterstützung bei
dieser Arbeit.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Einleitung..... 1

I. Modellsubstanzen für die Hydroxylaminreaktion 2
1. Nitrobenzol..... 2
2. Hydroxylamin..... 5
3. O-, m-, p-Nitrotoluol..... 7

II. Chloramphenicol..... 8

III. Nifedipin..... 17

IV. Nitrazepam..... 19
1. HCl-Spaltung..... 19
2. Reduktionsreaktion unter den Bedingungen der Ph.Eur. 20
3. Reduktion unter schonenderen Bedingungen..... 25
4. Verhalten der gelben amorphen Rohsubstanz im stark sauren und stark alkalischen Milieu..... 27
5. Zusammenfassung..... 30

V. Metronidazol..... 31

VI. Nitrofurantoin..... 39

VII. Die Reduktionsreaktion in Abhängigkeit von der Konstitution der Nitroverbindung..... 40

VIII. Zusammenfassung..... 61

IX. Beschreibung der Versuche..... 65

Einleitung

Es ist üblich, aromatische Nitrogruppen nachzuweisen, indem man im sauren Milieu bis zur Aminstufe reduziert, das Amin dann diazotiert und zu einem farbigen Produkt kuppelt.
Ein anderer Weg ist, die aromatische Nitrogruppe in neutralem bis schwach saurem Milieu bis zur Hydroxylaminstufe zu reduzieren. Das Hydroxylaminderivat kann dann benzoyliert werden, und das benzoylierte Derivat durch Komplexbildung mit Eisen(III)-salzen als violettes Farbprodukt nachgewiesen werden. Ein Beispiel für die Durchführung dieser Reaktion bietet die Ph.Eur., die Chloramphenicol auf diese Weise nachweisen läßt. Der Verlauf der Reaktion mit Chloramphenicol sollte untersucht werden, und dann die Reaktion auf andere aromatische Nitroverbindungen übertragen werden.

Die Vorschrift der Ph.Eur. lautet:

Etwa 10 mg Substanz werden in 1 ml Ethanol 50% (V/V) gelöst. Die Lösung wird nach Zugabe von 3 ml einer 1%igen Lösung (G/V) von Calciumchlorid R und 50 mg Zinkstaub R im Wasserbad 10 Minuten lang erwärmt. Nach dem Erkalten und Filtrieren werden zum Filtrat 0,1 g Natriumacetat R sowie 2 Tropfen Benzoylchlorid R hinzugefügt und 1 Minute lang geschüttelt. Die Lösung wird mit 0,5 ml Eisen(III)-chlorid-Lösung R 1 sowie 3 ml verdünnte Salzsäure R versetzt und gemischt. Es entsteht eine rotviolette Färbung. Die Prüfung wird ohne Zusatz von Zinkstaub wiederholt. Es entsteht keine Färbung.

I. Modellsubstanzen für die Hydroxylaminreaktion

1. Nitrobenzol

Nach der Ph.Eur. reduziert man Chloramphenicol durch Erwärmen mit Zinkstaub in einer verdünnten Calciumchloridlösung. Als einfaches Modell für diese Reaktion wurde Nitrobenzol verwendet. Reduziert man unter der Bedingung der Ph.Eur. mit $Zn/CaCl_2$, so entsteht weitgehend Phenylhydroxylamin. Wie das DC zeigt, wird Nitrobenzol dabei fast vollständig verbraucht, und die Reaktion bleibt auch nicht auf der Nitrosobenzolstufe stehen, was durch Ansprühen mit KI-Lösung und Salzsäure nachgewiesen wurde. Zum Vergleich wurden authentisches Phenylhydroxylamin[1)] und Nitrosobenzol[2)] hergestellt.

---

1) Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie 10/1, 4.Aufl., 1139 f., Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1971

2) Beyer, Lehrbuch der organischen Chemie, 17.Aufl., 486, S.Hirzel Verlag Stuttgart, 1973

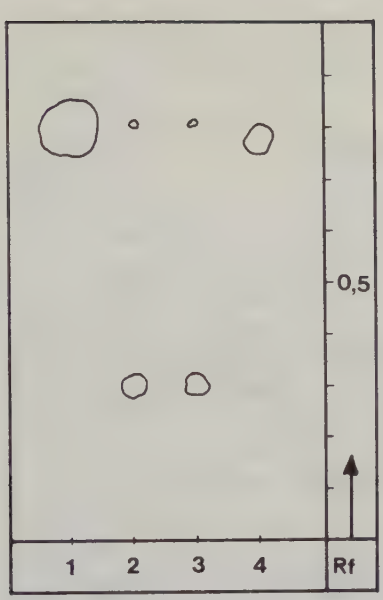


Abb.1:
Schematisches DC der Reduktionsprodukte des Nitrobenzols

Fließmittel: Methylenchlorid/Ether 9+1

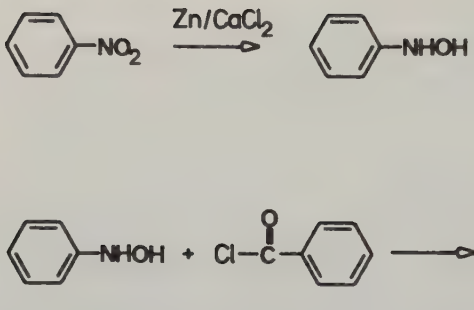
Detektion: UV-Licht
KI-Lösung und Salzsäure

1 = Nitrobenzol
2 = Mit $Zn/CaCl_2$-Lösung reduziertes Nitrobenzol (Probe)
3 = Authentisches Phenylhydroxylamin
4 = Authentisches Nitrosobenzol

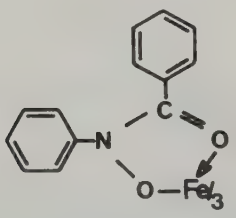
Setzt man den reduzierten Ansatz mit Benzoylchlorid in Gegenwart von Natriumacetat um, so kommt es zur Benzoylierung, wobei nach Zinner der Angriff am Stickstoff[3], nicht am Sauerstoff des Hydroxylamins erfolgt.

---

3) G.Zinner, Arch.Pharm. (Weinheim), 292, 329(1959)



Mit Eisen(III)-salzen entstehen violett gefärbte Komplexe:



Wie die später beschriebenen Untersuchungen ergeben, gelingt die Reaktion bei Verwendung von Nitrobenzol-Derivaten relativ selten. Während die Hydroxamsäure-Eisen(III)-Reaktion für N-unsubstituiertes Hydroxylamin allgemein positiv ausfällt, stellt der Substituent am Stickstoff eine Einschränkung für die allgemeine Anwendbarkeit dieser Reaktion dar.

Das UV-Spektrum des violetten Eisenkomplexes des benzoylierten Phenylhydroxylamins zeigt ein Absorptionsmaximum bei 515 nm.

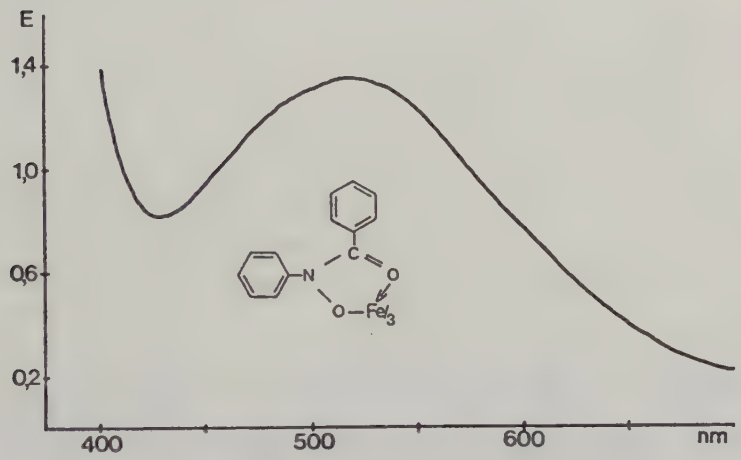


Abb.2: Elektronenspektrum des Farbproduktes mit Nitrobenzol analog Chloramphenicol Ph.Eur.
c = 9 mg/10 ml.

2. Hydroxylamin

Die einfachste Komponente, die anstelle des Chloramphenicols herangezogen werden kann, ist das Hydroxylamin selbst. Die Lösung besaß nach Durchführung der Reaktion ebenfalls eine tiefviolette Farbe, und das UV-Absorptionsmaximum lag wiederum bei 515 nm.

Statt Benzoylchlorid wurde daraufhin Acetylchlorid zum Reaktionsgemisch zugegeben. Es entstand eine klare, hellrotbraune Lösung (a). Nach eintägigem Stehenlassen war die Farbe in violett übergegangen (b).

Die Verschiebung der Absorptionsmaxima wird aus folgenden Spektren deutlich:

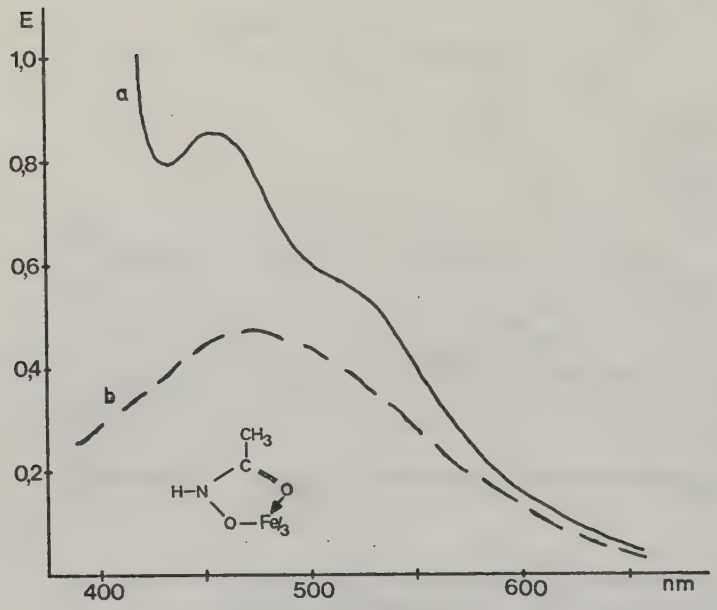


Abb.3: Elektronenspektren des Farbproduktes mit Hydroxylamin und Acetylchlorid analog Chloramphenicol Ph.Eur. c = 4 mg/10 ml
a) sofort gemesssen
b) Messung nach eintägigem Stehenlassen

Das Absorptionsmaximum der violetten Farblösung (Kurve b) liegt bei 475 nm. Das Fehlen eines aromatischen Ringes im Molekül ist für die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 515 nm auf 475 nm verantwortlich.

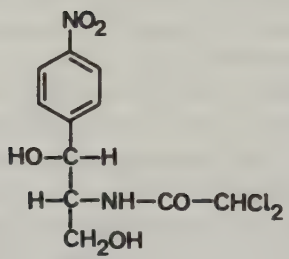
3. O-,m-,p-Nitrotoluol

Weiterhin wurde die Möglichkeit, die Farbreaktion nach Ph.Eur. auch auf andere Arzneimittel mit aromatisch gebundener Nitrogruppe übertragen zu können, anhand einfacher Substanzen getestet. Die Entstehung von Phenylhydroxylaminderivaten durch Reduktion der entsprechenden Nitroverbindungen wurde an zahlreichen Beispielen eingehend untersucht[4]. Bei den untersuchten Verbindungen handelt es sich um unterschiedlich substituierte Nitroaromaten, die keinen basischen Stickstoff im aromatischen Ring enthalten. Unter den Reduktionsbedingungen, wie sie auch die Ph.Eur. in der Monographie für Chloramphenicol vorschreibt, entstehen dabei ausschließlich Phenylhydroxylaminderivate.
So entsteht auch aus o-[5] und m-Nitrobenzol[6] jeweils das entsprechende Phenylhydroxylaminderivat, aus p-Nitrotoluol dagegen nicht.
Mit Eisen(III)-salzen entsteht bei pH 5 der violette Farbkomplex, der ebenfalls bei 515 nm das Absorptionsmaximum besitzt.

---

4) Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie 10/1, 4.Aufl., 1143 ff., Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1971
5) E.Bamberger u. A.Rising, Ann.Chem. 316, 278(1901)
6) E.Bamberger u. A.Rising, Ann.Chem. 316, 280, 283 ff., (1901)

II. Chloramphenicol



D-threo-2-Dichloracetamido-1-(4-nitrophenyl)-propan-1,3-diol

Die Reaktion mit Chloramphenicol führte zu einem mehrere Tage stabilen Farbkomplex. Die Umsetzung dieser offizinellen Substanz wurde in allen Einzelheiten untersucht.

Die Lösung des Chloramphenicols mit Calciumchlorid und Zinkstaub war vor und nach dem Erwärmen farblos und färbte sich nach dem Abkühlen und Filtrieren gelb (pH 5). Nach Zusatz von Natriumacetat (pH 7) und Benzoylchlorid (pH 5) erfolgte wieder Eintrübung, die gelbe Farbe verschwand, und es schieden sich auf der Oberfläche kleine, fettartige, zuweilen bräunliche Tröpfchen ab. Außerdem fiel eine weiße, kristalline Substanz aus. Nach Zugabe von $FeCl_3$ schied sich ein braunroter Niederschlag ab, der nach Zugabe von HCl in Lösung ging. Die Lösung war rotviolett gefärbt. Hier war dann weiteres Ausfallen weißer, kristalliner Substanz zu beobachten, die abfiltriert wurde. Die kristalline Substanz wurde als Benzoesäure identifiziert. Die so erhaltene Farblösung ist haltbar und zeigt auch nach mehrtägigem Stehen keine, für das Auge sichtbare, Veränderung.

Auffällig bei der Durchführung dieser Reaktion war die große Farbabhängigkeit von der Konzentration an Chloramphenicol und dem pH der Lösung nach Zugabe von Natriumacetat. In der Ph.Eur.-Monographie wird die Bildung eines rotvioletten Farbproduktes gefordert. Bei Verwendung von wasserfreiem Natriumacetat R wird nach dessen Zugabe unter den hier angegebenen Versuchsbedingungen ein pH-Wert von 7 erreicht, und es tritt nach Zusatz von Benzoylchlorid, $FeCl_3$ und Salzsäure die rotviolette Farbe auf. Wird wasserhaltiges Natriumacetat verwendet, erreicht die Lösung nur pH 6, und das Farbprodukt ist stärker violett gefärbt.

Die gleiche Farbvertiefung von Rotviolett nach Dunkelviolett ist bei Verwendung steigender Konzentrationen an Chloramphenicol zu beobachten, auch wenn durch Zusatz von jeweils 100 mg Natriumacetat R jedesmal ein pH-Wert von 7 erreicht wurde. Wie folgendes Spektrum zeigt, liegen die UV-Absorptionsmaxima aller Farblösungen im Bereich von 515 nm.

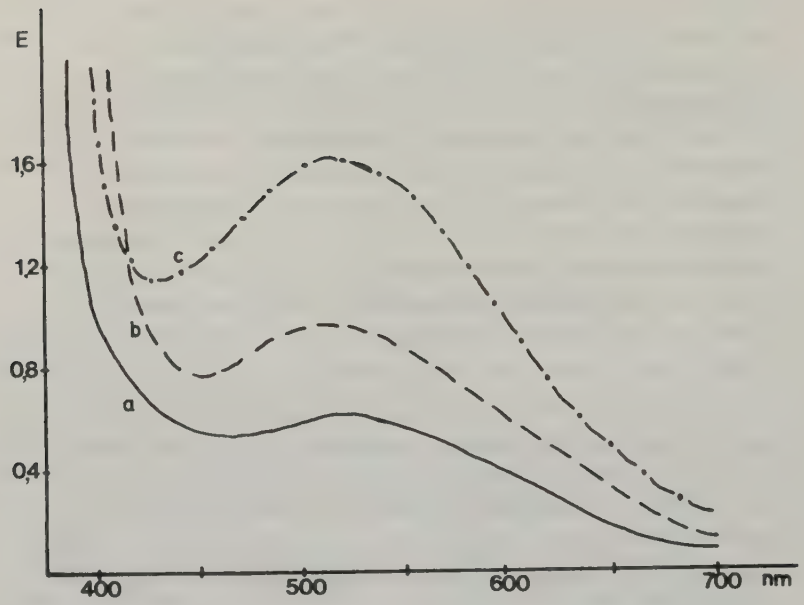


Abb.4: Elektronenspektren des Farbproduktes mit Chloramphenicol nach Ph.Eur., steigende Konzentrationen:

——— = 10 mg/10 ml Farblösung
----- = 12 mg/10 ml Farblösung
-·-·-·= 16 mg/10 ml Farblösung

Geeignete Extinktionswerte zur UV-spektrophotometrischen Auswertung der Farbreaktion des Chloramphenicols nach Ph.Eur. konnten nur bei Chloramphenicol-Konzentrationen zwischen 8 und 16 mg/10 ml Farblösung erhalten werden. Bei Verwendung von weniger als 8 mg Chloramphenicol war kein Maximum zu erkennen, Extinktionswerte von Lösungen mit mehr als 16 mg waren nicht mehr meßbar. Innerhalb des angegebenen Konzentrationsbereiches ist der Kurvenverlauf fast linear. Bei Verdünnung zu hoher Konzentrationen auf die Hälfe ergaben sich unproportionale Werte.

Die quantitative Auswertung des bei der Reduktion nicht umgesetzten Chloramphenicols erfolgte nach DAB 7 ebenfalls UV-spektrophotometrisch (Ph.Eur. gibt keine Gehaltsbestimmung an). Bei dieser Bestimmung wird die Extinktion einer Chloramphenicol-Lösung bestimmter Konzentration bei 278 nm gemessen. Bei der Gehaltsbestimmung von reinem Chloramphenicol soll $E^{1\%}_{1cm}$ einem Gehalt von 100 ± 3% entsprechen.

Auch der zum Hydroxylaminderivat reduzierte Chloramphenicolansatz hat bei 278 nm ein geringes Absorptionsmaximum, das auf restliches Chloramphenicol zurückzuführen ist. Auch authentisches Phenylhydroxylamin besitzt bei 275 nm das Absorptionsmaximum. Eine genaue Aussage über die Menge des nicht umgesetzten Chloramphenicols war infolgedessen nicht möglich.

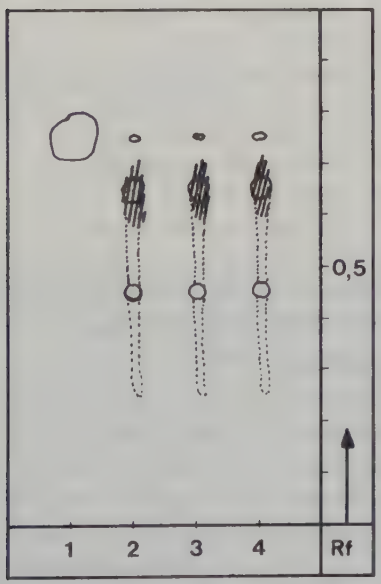


Abb.5:
Schematisches DC des Chloramphenicols und des mit $Zn/CaCl_2$ reduzierten Chloramphenicols

Fließmittel: Chloroform/Isopropanol/Ammoniak (25%)
40+50+10

Detektion: UV-Licht
KI/HCl
● Fleck färbt sich nach dem Besprühen gelb.

1 = Chloramphenicol, Ew.: 10 mg
2 = Mit $Zn/CaCl_2$ reduziertes Chloramphenicol, Ew.: 10 mg
3 = Mit $Zn/CaCl_2$ reduziertes Chloramphenicol, Ew.: 15 mg
4 = Mit $Zn/CaCl_2$ reduziertes Chloramphenicol, Ew.: 20 mg

Wie das DC in Abb.5 zeigt, setzt sich Chloramphenicol fast vollständig um. Im UV-Licht war der Chloramphenicol-Fleck der Bahn 2 nur sehr schwach sichtbar und wurde bei steigender Konzentration entsprechend stärker (Bahnen 3 und 4). Der Fleck vom Rf-Wert 0,65 färbte sich nach dem Besprühen mit KI-Lösung und Salzsäure dauerhaft gelb. Man kann vermuten, daß als Zwischenprodukt das Nitrosoderivat des Chloramphenicols auftritt, das Kaliumiodid im Sauren zu Iod oxidiert und dabei selbst zum Hydroxylaminderivat reduziert wird.

Wie aus den vorangegangenen Untersuchungen hervorgeht, entsteht der violette Farbkomplex, dem die auf S.4 dargestellte Ringstruktur zukommen soll, auch bei Verwendung einfacher analoger Substanzen. Es ist aber auch eine andere Struktur des Komplexes denkbar, die unter Beteiligung der Dichloracetamido-Seitenkette des aliphatischen Molekülteils entstehen könnte. Diese Möglichkeit scheint nach Dreiding-Modellmolekülen nicht ausgeschlossen.

Das Modell zeigt, daß die beiden Chloratome der Seitenkette je eine Ligandenstelle des Eisens besetzen können, so daß für einen solchen Komplex nur zwei Moleküle Chloramphenicol benötigt würden. Ein Komplex dieser Struktur ist möglicherweise stabiler als der ringförmige Hydroxamsäure-Fe(III)-Komplex, zu dessen Bildung drei Moleküle des reduzierten Nitroaromaten notwendig sind.

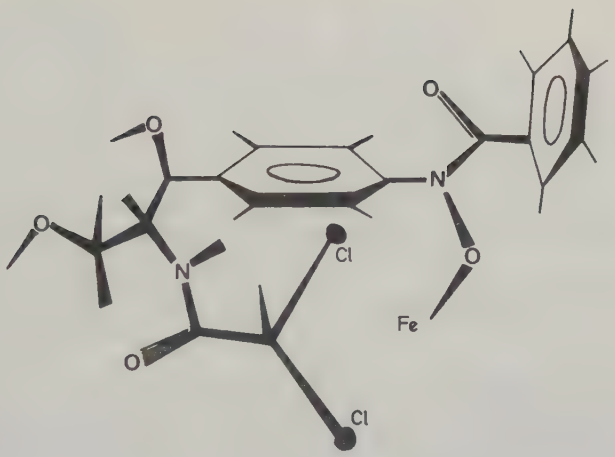


Abb.6: Zeichung eines Dreidingmodells des Hyroxamsäure-Fe(III)-Komplexes des Chloramphenicol-Moleküls

Abhängigkeit der Komplexbildung mit Fe(III)-salzen von der Anwesenheit basischen Stickstoffes.

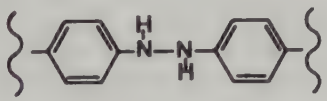
Um herauszufinden, ob die Hydroxamsäure-Fe(III)-Komplexbildung auch noch bei Anwesenheit basischen Stickstoffs möglich ist, wurde die Reaktionslösung in verschiedenen Ansätzen mit konzentriertem Ammoniak, verdünntem Ammoniak und Anilin (pK_b: 9,37) versetzt. Die Basen wurden jeweils einmal vor und einmal nach der Reduktion zugesetzt. (C. = Chloramphenicol)

Tabelle 1

	Chloramphenicol	C. + NH_3 konz.	C. + NH_3 verd.	C. +Anilin pK_b: 9,37
a) Zusatz vor der Reduktion				
pH der Lösung	6	> 11	8-9	7
Farbe der Lsg. nach d. Reduktion	schwach gelb	stark gelb	gelb	schwach gelb
pH nach Zusatz von Na-acetat und Benzoylchlorid	5	6	5	5
Bldg. der violetten Farbe	+ rotviolett	-	+ blaßviolett	+ rotviolett
UV-Absorptionsmaximum	515 nm		515 nm	515 nm
b) Zusatz nach der Reduktion				
pH der Lösung		> 11	8-9	7
pH nach Zusatz v. Na-acetat und Benzoylchlorid	-	6	5	5
Bldg. der violetten Farbe		-	+ violett	+ rotviolet
UV-Absorptionsmaximum			515 nm	515 nm

Die Bildung des violetten Farbproduktes ist vom pH-Wert abhängig, bei dem das $FeCl_3$ zur Reaktionslösung zugesetzt wird. Der violette Komplex entsteht nur bei pH 5 bis höchstens 6. Liegt der pH-Wert unter 5, entsteht nach $FeCl_3$-Zugabe ein blaßbrauner Niederschlag, der auf Zusatz von Salzsäure in eine stark gelb gefärbte Lösung übergeht. Liegt der pH-Wert über 6, entsteht ein brauner Niederschlag, der nach Ansäuern mit Salzsäure eine klare, rotbraune Farbe gibt. Bei weiterer Zugabe von Salzsäure oder starker Verdünnung mit Wasser geht die Farbe ebenfalls in gelb über. Die rotbraune Lösung besitzt im sichtbaren UV-Bereich kein ausgeprägtes Absorptionsmaximum.

Wird konzentrierter Ammoniak vor der Reduktion zugesetzt, entsteht nach dem Erwärmen eine stark gelbe Lösung. Es ist wahrscheinlich, daß dabei das stabile Endprodukt der Reduktion im alkalischen, die Hydrazoverbindung, entsteht, so daß kein Hydroxylaminderivat für die weitere Reaktion zur Verfügung steht.



HYDRAZOGRUPPIERUNG

Wird konzentrierter Ammoniak nach der Reduktion zugegeben, kommt ebenfalls kein violetter Farbkomplex zustande, obwohl der pH-Wert nach Zugabe von Natriumacetat und Benzoylchlorid 6 beträgt.

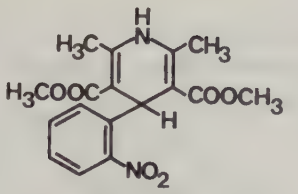
Auch bei Verwendung von verdünntem Ammoniak entstehen möglicherweise zum Teil die Endprodukte der alkalischen Reduktion, so daß nur eine geringe Menge an Hydroxylaminderivat zur Verfügung steht. Der Farbkomplex am Schluß ist blaßviolett.

Keine Beeinflussung des Reaktionsablaufes bewirkt die Zugabe des Anilins, da die pH-Werte in allen Reaktionsphasen denen beim Reaktionsablauf ohne Basenzusatz gleichen.
Alle entstandenen violetten Farblösungen besaßen ein UV-Absorptionsmaximum von 515 nm.

Auffällig war, daß nach Zusatz von konzentriertem Ammoniak zur violetten Farblösung und Ausfallen von braunem Eisen(III)-hydroxid sich der violette Komplex nach vorsichtiger Zugabe von verdünnter Salzsäure zurückbildete. Bei Überschuß an Salzsäure ging die violette Farbe in gelb über. Die Reaktion ist bis zu einem gewissen Grade reversibel.

Zusammenfassend ergaben diese Versuche, daß der Zusatz von Verbindungen, die basischen Stickstoff enthalten, sich nur dann störend auswirkt, wenn sich die für die Reaktion erforderlichen pH-Werte der Reaktionslösung verändern.
Zu anderen Ergebnissen kommt man, wenn sich der basische Stickstoff in dem Molekül befindet, dessen aromatisch gebundene Nitrogruppe unter den Bedingungen der Ph.Eur. reduziert wird.

III. Nifedipin (Adalat^{R})



1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitro-phenyl)-pyridin-3,5-dicarbonsäure-dimethylester

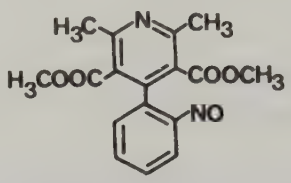
Nifedipin ist eine labile Verbindung, die nur in besonders stabilisierten galenischen Zubereitungen im Handel ist. Die Instabilität der Substanz ist in erster Linie durch ihre hohe Lichtempfindlichkeit bedingt. Sowohl auf der DC-Platte als auch in Lösung tritt innerhalb sehr kurzer Zeit eine partielle Umwandlung in das Nitroso-Derivat unter Rearomatisierung des Dihydropyridinringes ein. Wurden die Untersuchungen zur Stabilitätsverminderung in 0,1N-HCl durchgeführt, vollzog sich die Umwandlung zum Nitroso-Derivat innerhalb einer Stunde quantitativ[7].

Zur analytischen Nachweisreaktion analog Chloramphenicol nach Ph.Eur. wurde der Inhalt einzelner Kapseln (10 mg) in Ethanol gelöst und die Reaktion analog Chloramphenicol durchgeführt. Zum Schluß zeigte die Lösung eine dunkelbraune Färbung, die innerhalb weniger Sekunden hell und durchsichtig wurde. Nach eintägigem Stehenlassen war die Farbe wieder in dunkelbraun übergegangen.

---

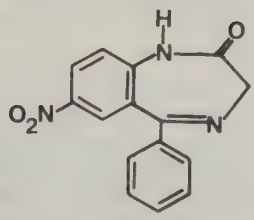
7) S.Ebel, H.Schütz, A.Hornitschek, Arzneim.-Forsch./ Drug Res. 28(II), 2188-2193(1978).

Um den Einfluß des basischen Stickstoffes im Dihydropyridinring zu vermindern, wurde der Inhalt einer Kapsel 30 Minuten lang mit 0,1N-HCl auf 80°C erwärmt. Danach wurde mit Ammoniak auf pH 7 neutralisiert, worauf-hin eine gelbe Substanz ausfiel. Diese Substanz wurde durch das Massenspektrum als das Nitroso-Derivat des Nifedipins identifiziert (MG: 328).



Das Nitroso-Derivat wurde dann als solches unter den Bedingungen der Ph.Eur. reduziert, wobei am Schluß ebenfalls keine violette, sondern eine gelbe Farblösung entstand.

IV Nitrazepam (Mogadan^{R})



7-Nitro-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-on

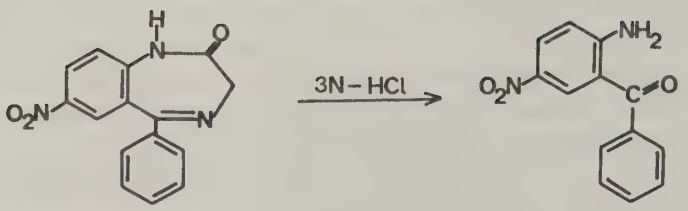
1. HCl-Spaltung

Zunächst wurde mit Nitrazepam eine HCl-Spaltung durchgeführt, da gute Nachweismöglichkeiten einiger anderer Benzodiazepine nach HCl-Spaltung bereits möglich waren. So entsteht aus Chlordiazepoxid nach saurer Hydrolyse 2-Amino-5-chlor-benzophenon [8)9)].

Bei der analogen Reaktion mit Nitrazepam fällt nach dem Erhitzen auf dem Wasserbad eine gelbe, kristalline Substanz aus, die bei 140°C schmilzt, und die dünnschichtchromatographisch einheitlich war.

---

8) G.A.Archer and L.H.Sternbach, The chemistry of Benzodiazepines, Chem.Rev. 68, 747(1968)
9) L.H.Sternbach and E.Reeder, J.Org.Chem., 26, 1111(1961)



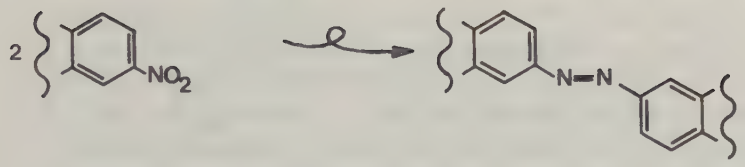
2-AMINO-5-NITRO-
BENZOPHENON

MG 242

Die Identitätsprüfung für aromatische Amine nach Ph.Eur. durch Diazotierung und Kupplung verlief positiv.
Die Elementaranalyse zeigte gute Übereinstimmung mit den erwarteten theoretischen Werten.
Die eindeutige Identifizierung der gelben Kristalle als 2-Amino-5-nitro-benzophenon erfolgte massen-, IR-, und NMR-spektroskopisch.
Nach der Reduktion des 2-Amino-5-nitro-benzophenons mit $Zn/CaCl_2$-Lösung entstand nach Benzoylierung und Zugabe von $FeCl_3$ keine violett gefärbte Lösung.

2. Reduktionsreaktion unter den Bedingungen der Ph.Eur.

Nach den Reduktionsbedingungen der Ph.Eur. zum Nachweis aromatischer Nitrogruppen über die Hydroxylaminstufe entstand mit Nitrazepam kein violett gefärbter Eisenkomplex. Nach 10minütigem Erwärmen mit Zinkstaub im neutralen Milieu und Abkühlen der Lösung fiel eine dunkelgelbe, amorphe Substanz aus. Sie zersetzte sich bei 265°C und verkohlte bei 310°C. Die Untersuchung des gelben Produktes ergab, daß es sich dabei um das stabile Endprodukt der Reduktion im neutralen Milieu, die Azoverbindung, handelt.



Nach dem Auffinden eines geeigneten Fließmittelgemisches trennte sich die gelbe amorphe Substanz auf dem DC in ein Hauptprodukt (Rf: 0,48) und in geringer Menge auftretende Nebenbestandteile (Rf etwa 0,22) auf.

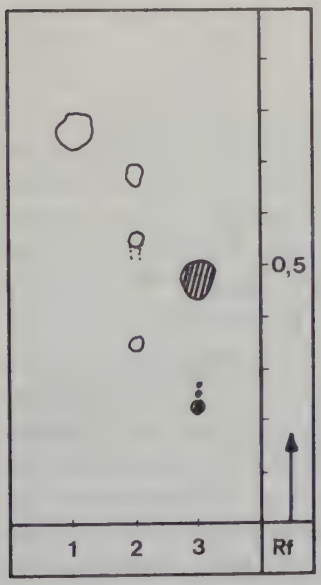


Abb.7:
Schematisches DC der Reaktionsprodukte nach Reduktion des Nitrazepams

Fließmittel: Chloroform/ Methanol 9,2+0,8

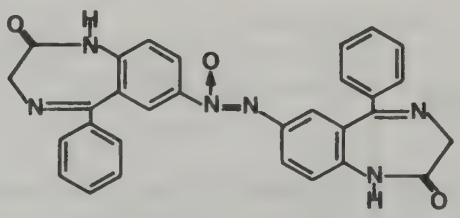
Detektion: UV-Licht

● Fleck färbt sich an der Luft gelb

1 = Nitrazepam
2 = Nitrazepam + $Zn/CaCl_2$-Lösung, kalt
3 = gelbe amorphe Substanz

Bei der Reduktion von Nitroverbindungen unter sehr milden Reaktionsbedingungen, d.h. im neutralen bis schwach sauren Milieu, bilden sich der Literatur nach trans-Azoxy- bzw. Azoverbindungen. Der Entstehung solcher dimerer Produkte ist ein Redoxgleichgewicht zwischen Nitroso- und Hydroxylaminderivat vorgelagert. In Abhängigkeit von der Struktur des Moleküls können diese als monomere Endprodukte ausfallen oder nach Durchlaufen löslicher Zwischenstufen zu dimeren Verbindungen kondensieren. Die primär entstehenden, schwach gelb gefärbten Azoxyverbindungen können durch überschüssiges Reduktionsmittel bzw. energischere Reaktionsbedingungen in die stärker farbige Azoverbindung überführt werden[10].

Im Falle des Nitrazepams waren die gelben amorphen Produkte verschiedener Reaktionsansätze unterschiedlich stark gelb gefärbt. Das ausfallende Produkt konnte also einer Azoxy- bzw. Azoverbindung zugeordnet werden.

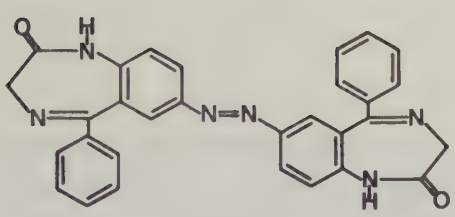


trans-AZOXYVERBINDUNG

MG 514

---

10) Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie 10/3, 4.Aufl., 752 f., Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1965



trans-AZOVERBINDUNG
MG 498

Die zuerst ausfallenden gelben amorphen Produkte wurden säulenchromatographisch fraktioniert. Von der rohen gelben amorphen Substanz und dessen durch Säulenchromatographie isolierten Hauptbestandteils (Rf-Wert 0,48) wurden Massenspektren aufgenommen. Beim Vergleich beider Spektren konnte weitgehende Übereinstimmung festgestellt werden, da sie wesentliche Peaks gemeinsam haben. Im Massenspektrum des gelben amorphen Rohproduktes treten lediglich zwischen m/e 42 und m/e 249 mehr Peaks auf. Abgebildet ist hier nur das Massenspektrum des gelben amorphen Rohproduktes (Abb.8, S.24).

Der Molekülpeak, der nur sehr geringe Intensität besitzt, erscheint bei m/e 514 , was der Azoxyverbindung entspricht, der Basispeak bei m/e 498 (≙ Azoverbindung). Der Massenpeak bei m/e 249 kann als das monomere Spaltprodukt der Azoverbindung vom Molekulargewicht 498 angesehen werden. Die Tatsache, daß sowohl der Massenpeak bei m/e 498 als auch dessen Monomeres bei m/e 249 um jeweils 28 und 42 Masseneinheiten vermindert wird, bestätigt die Annahme, daß es sich bei der vorliegenden Verbindung um ein dimeres Produkt aus zwei identischen Molekülen handelt.

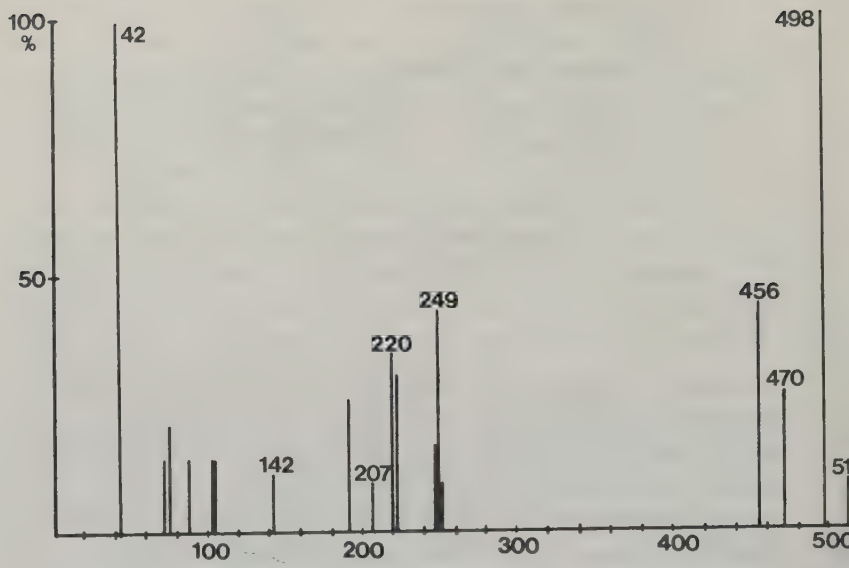


Abb.8: Massenspektrum des gelben amorphen Produktes
Probe: 270°C
Ionenquelle: 250°C, 70 eV, Direkteinlaß

Die Elementaranalyse der gelben amorphen Rohsubstanz und des isolierten Hauptproduktes wiesen Schwankungen bezüglich der elementaranalytischen Werte auf, so daß hieraus keine klare Aussage über die Identität der vorliegenden Substanz gemacht werden konnte.
Auch der Vergleich beider IR-Spektren führte zu keinem eindeutigeren Ergebnis.

Der bei M^+514 auftretende Molekülpeak entspricht der Azoxyverbindung. Die Intensität dieses Molekülpeaks ist zwar nur gering, da der Peak jedoch keinen quantitativen Aussagewert besitzt, mußte die Identität der gelben amorphen Substanz durch Herstellung der authentischen Az-

oxyverbindung und Vergleich mit der gelben amorphen Rohsubstanz auf dem DC nachgewiesen werden.

3. Reduktion unter schonenderen Bedingungen

Reduziert man Nitroverbindungen im neutralen Milieu unter sehr milden Reaktionsbedingungen bei Raumtemperatur so entstehen primär Azoxyverbindungen, die nur schwach gelb gefärbt sind. Diese können dann durch überschüssiges Reduktionsmittel bzw. energischere Reaktionsbedingungen in die stärker farbige Azoverbindung überführt werden. Alkalizusatz beschleunigt die Reaktion, führt jedoch häufig nicht zu einheitlichen trans-Azoxyverbindungen wie bei der Kondensation im neutralen Milieu[11].
Die Azoxyverbindung aus Nitrazepam wurde auf diese Weise hergestellt und ihre Identität durch das Massenspektrum bestätigt. In diesem Spektrum stellte der Molekülpeak bei m/e 514 gleichzeitig den Basispeak dar.
Die Azoxyverbindung wurde dünnschichtchromatographisch mit dem gelben amorphen Rohprodukt verglichen. Dabei wurde festgestellt, daß das gelbe Produkt, das unter den Reduktionsbedingungen der Ph.Eur. entsteht, sich nicht ganz gleich verhält wie die authentische Azoxyverbindung. Reduziert man die authentische Azoxyverbindung unter energischeren Bedingungen mit $Zn/CaCl_2$ weiter, so entstehen auf dem DC die gleichen Flecke mit denselben Rf-Werten wie bei dem gelben amorphen Rohprodukt (Position 2,5).

---

11) A.Reissert, Ber.Dtsch.Chem.Ges. 42, 1364(1909)

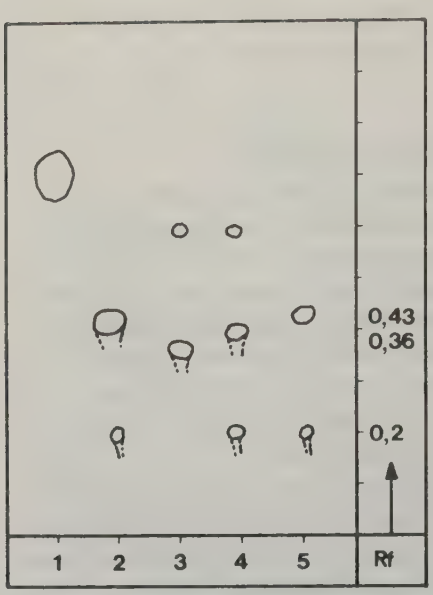


Abb.9:
Schematisches DC der Reaktionsprodukte nach Reduktion des Nitrazepams

Fließmittel: Chloroform/ Methanol 9,2+0,8

Detektion: UV-Licht

1 = Nitrazepam
2 = Gelbes amorphes Rohprodukt
3 = Authentische Azoxyverbindung
4 = Gemisch aus 2 + 3
5 = Azoverbindung durch Reduktion der authentischen Azoxyverbindung unter energischeren Reaktionsbedingungen.

Nachdem es sich bei dem Hauptprodukt der Reduktion des Nitrazepams um die Azoverbindung handelt, bleibt noch zu klären, warum die durch Säulenchromatographie isolierte Azoverbindung trotzdem im Massenspektrum den Molekülpeak bei M^+514 aufweist.
Wie aus dem DC hervorgeht, geben die jeweiligen Hauptprodukte der Reaktion fast gleiche Rf-Werte (Position 2- Rf: 0,43, Position 3 - Rf: 0,36). Im Gemisch beider Verbindungen ergeben diese beiden Produkte nur einen gemeinsamen Fleck (Position 4 - Rf: 0,36). Isoliert man diesen Fleck durch Säulenchromatographie, so

besteht er nach seinen analytischen Daten zwar hauptsächlich aus der Azoverbindung, ist jedoch etwas verunreinigt durch die Azoxyverbindung.
Man kann also davon ausgehen, daß sich bei der Bildung des gelben amorphen Rohproduktes durch Reduktion des Nitrazepams die primär entstehende Azoxyverbindung nicht quantitativ in die Azoverbindung umsetzt, wofür auch die Entstehung unterschiedlich stark gelb gefärbter Produkte spricht.

4. Verhalten der gelben amorphen Rohsubstanz im stark sauren und stark alkalischen Milieu.

Beim Versetzen des gelben amorphen Produktes mit konzentrierter Schwefelsäure entsteht eine gelborange Farblösung, die nach geringer Verdünnung mit Wasser in kräftiges Rot übergeht und nach starker Verdünnung farblos wird. Bei Verwendung von 50%iger Schwefelsäure tritt ebenfalls die gelborange Farbe auf, die bei weiterer Verdünnung aber verblaßt. Mit konzentrierter Salzsäure entsteht sofort die rote Farblösung.
Beim Alkalisieren der sauren Lösung geht die rote Farbe über Gelborange im schwach sauren bis leuchtend Gelb im stark alkalischen. Kurz vor Erreichen des Äquivalenzpunktes wird die Lösung hellgelb und trübe, wobei etwas Substanz ausfällt. Bei weiterer Verschiebung des pH ins Alkalische geht die Substanz wieder in Lösung unter Bildung der klaren, stark gelben Farblösung.
Wie das Elektronenspektrum (Abb.10) zeigt, verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 500 nm im sauren auf 400 nm im alkalischen. Die Messung erfolgte nach Herstellung einer schwefelsauren Farblösung von pH 1 und einer natronalkalischen Lösung von pH 14.

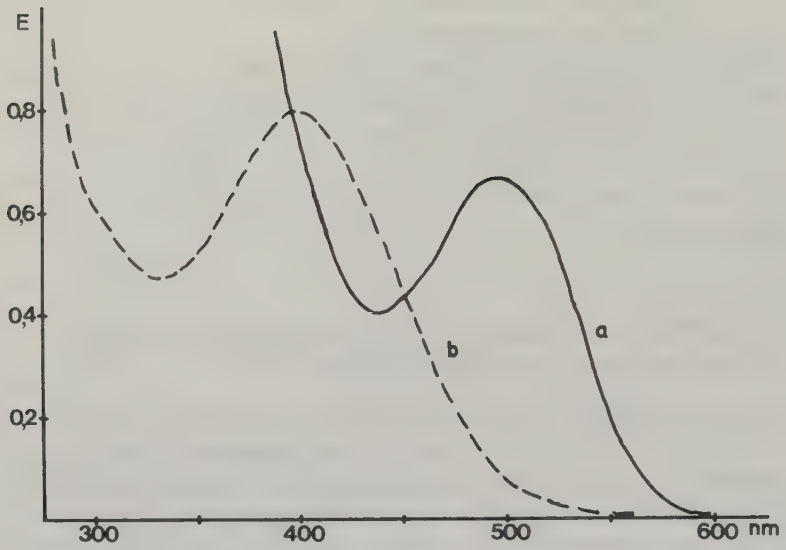
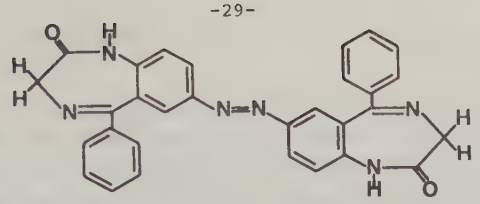
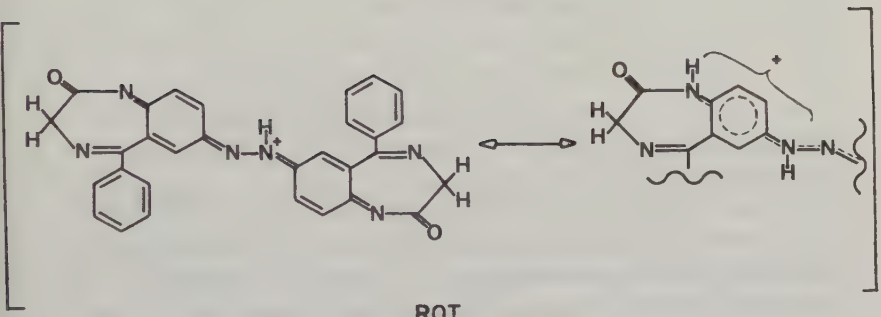


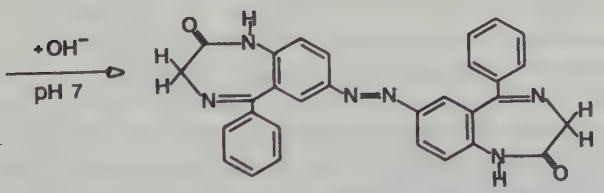
Abb.10: Elektronenspektren des gelben amorphen Produktes
a) in Schwefelsäure (pH 1)
b) in Natronlauge (pH 14)

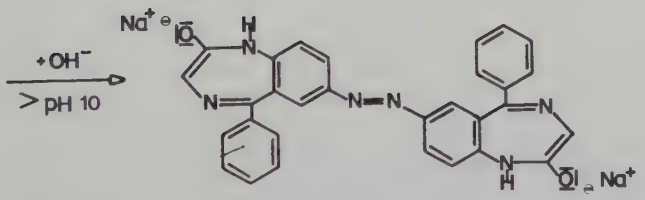
Es ist folgender Reaktionsablauf während des Farbwechsels denkbar:





ROT





GELB

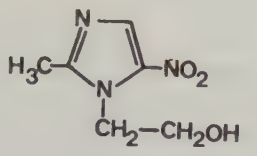
5. Zusammenfassung

Nach Reduktion des Nitrazepams mit $Zn/CaCl_2$ unter Erwärmen entstand nach Benzoylierung und Zusatz von $FeCl_3$ keine Violettfärbung, sondern es schied sich ein gelbes amorphes Rohprodukt ab, das bei verschiedenen Ansätzen unterschiedlich stark gelb gefärbt war. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung ergab, daß das gelbe Produkt nicht einheitlich ist, sondern sich in ein Hauptprodukt und wenig Nebenbestandteile aufgliedert.

Durch Reduktion unter milderen Bedingungen wurde die authentische Azoxyverbindung hergestellt. Der Vergleich mit dem gelben amorphen Rohprodukt auf dem DC ergab, daß beide etwas unterschiedliche Eigenschaften hatten. Durch energischere Reduktion der authentischen Azoxyverbindung entstand aber die Azoverbindung, die auf dem DC dieselben Flecke mit denselben Rf-Werten gab wie bei der Standardreaktion.
Die eingehenderen Untersuchungen des Hauptbestandteils des gelben amorphen Rohproduktes ergab, daß er zur Hauptsache aus der Azoverbindung besteht, jedoch mit nicht vollständig umgesetzter Azoxyverbindung verunreinigt ist.

Beim Versetzen des gelben amorphen Rohproduktes mit konzentrierter Säure und anschließendem Alkalisieren wies die Substanz unterschiedliche Farbigkeit auf. Es kam zur Entstehung einer kräftig roten Farblösung im stark sauren, und die Farbe wechselte über Gelborange im schwach sauren bis zu leuchtendem Gelb nach Alkalizusatz.

V. Metronidazol (Clont^{R})



2-(2-Methyl-5-nitroimidazol-1-yl)-ethanol

Reduktionsreaktion unter den Bedingungen der Ph.Eur.

Bei der Reduktion des Metronidazols, in dem die Reaktivität der Nitrogruppe dem Einfluß des basischen Imidazolringes unterliegt, entsteht kein violett gefärbter Eisenkomplex.
Nach 10minütigem Erwärmen mit Zinkstaub im neutralen Milieu entstand eine rotorange Lösung, deren pH-Wert 9 betrug und die um so farbintensiver wurde, je länger man sie erwärmte. Es gelang nicht, aus der roten Lösung mit organischen Lösungsmitteln eine farbige Substanz auszuschütteln. Auch bei Verschiebung des pH-Wertes ins neutrale- bzw. saure Milieu erfolgte kein Übergang eines Reaktionsproduktes in die organische Phase.

Identifizierung des Hauptproduktes nach der Reduktion des Metronidazols.

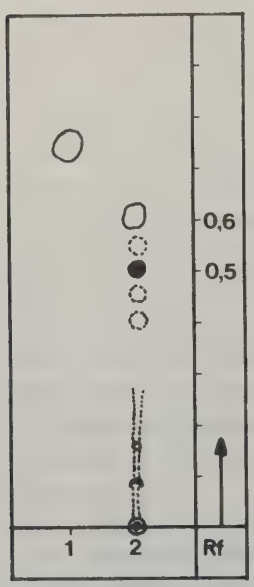


Abb.11:
Schematisches DC des Metronidazols und des mit $Zn/CaCl_2$ Lösung reduzierten Metronidazols

Fließmittel: Chloroform/ Methanol 8+2

Detektion: UV-Licht

● der Fleck färbt sich an der Luft leicht gelb, bei 366 nm fluoresziert er dunkel, bei 254 nm grünlich

1 = Metronidazol
2 = mit $Zn/CaCl_2$ reduziertes Metronidazol

Wie auf dem Dünnschichtchromatogramm zu erkennen ist, entsteht nach der Reduktion ein Substanzgemisch. Im UV-Licht zeigen die Substanzen vom Start bis zum Rf-Wert 0,35 bei 254 nm starke blaue und rosafarbene Fluoreszenz. Auffällig im langwelligen UV-Licht ist der dunkelgelb erscheinende Fleck vom Rf-Wert 0,5, der sich beim Einengen der Lösung weiter zersetzt. Hauptbestandteil der Reduktion ist das Produkt vom Rf-Wert 0,6, das quantitativ am meisten entsteht und auch nach längerer Zeit auf dem DC keine Veränderungen zeigt.
Es wurde die Substanz vom Rf-Wert 0,6 durch Säulenchromatographie isoliert und untersucht. Die Rückstände aus dem

Eluat mußten nach dem Abdampfen des Fließmittels in Chloroform gelöst werden, um sie von einer größeren Menge chloridhaltiger Verunreinigungen zu befreien, die zunächst die Ergebnisse der Elementaranalyse stark beeinflußten. Wurde die Chloroformphase nochmals zur Trockne eingeengt und der Rückstand in Ether gelöst, konnte hieraus das fast farblose bis schwach gelblich gefärbte Produkt kristallin erhalten werden.
Beim Einsatz von 200 mg Metronidazol wurden ca. 3 mg des Hauptproduktes erhalten.

Anhaltspunkte zur Identifizierung des Hauptproduktes der Reduktion lieferte das IR-Spektrum. Abgebildet sind im folgenden die Spektren des Metronidazols (Abb.12), des Hauptproduktes der Reduktion (Abb.13) und zum Vergleich das des Cyclohexanonoxims (Abb.14).

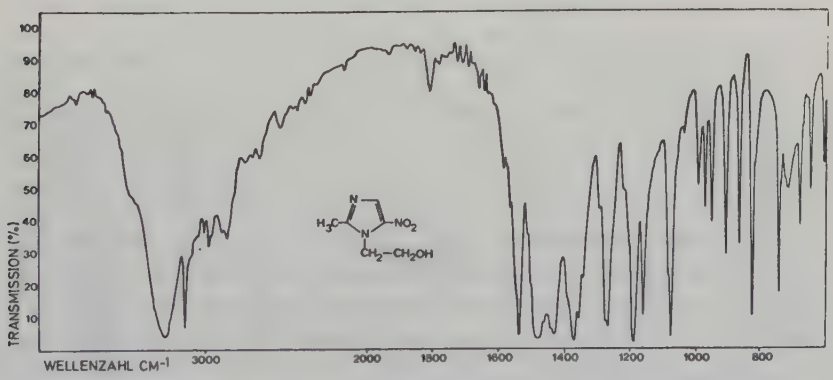


Abb.12: IR-Spektrum des Metronidazols, gemessen in wasserfreiem Kaliumbromid

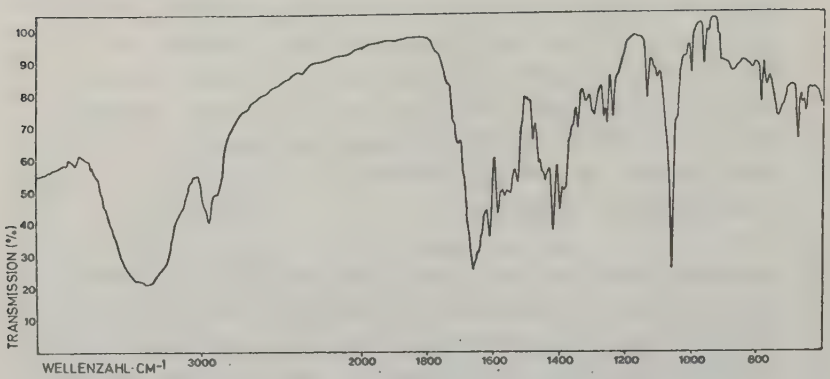


Abb.13: IR-Spektrum des Hauptproduktes der Reduktion von Metronidazol, gemessen in wasserfreiem KBr

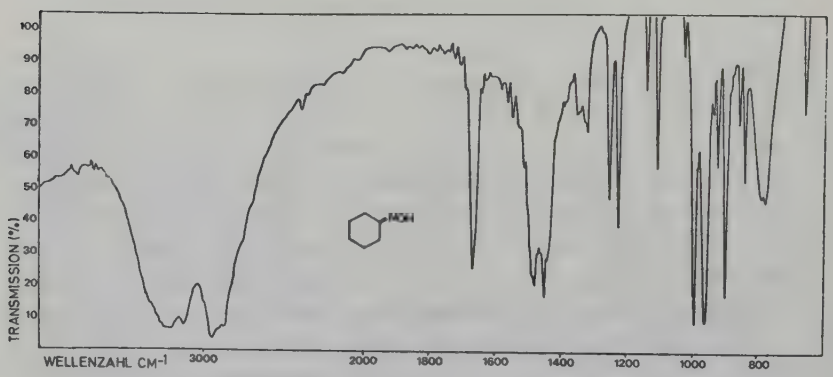


Abb.14: IR-Spektrum des Cyclohexanonoxims, gemessen in wasserfreiem KBr

Imidazol besitzt im festen Zustand infolge intermolekularer Verbrückung eine in zahlreiche "Satellitenbanden" aufgespaltene breite Absorption zwischen 3000 cm^{-1} und 2500 cm^{-1} [12]. Ebenfalls charakteristisch für Imidazole ist eine schwache Bande bei 1820 cm^{-1}, die beim Metronidazol-Spektrum gut sichtbar ist[13] (Abb.12). Das IR-Spektrum des isolierten Hauptproduktes (Abb.13) ergibt ein anderes Bild. Die oben beschriebenen Satellitenbanden fehlen, ebenso die Bande bei 1820 cm^{-1}. Die Schwingungen der Nitrogruppen sind nicht mehr vorhanden. Der fingerprint-Bereich zeigt ebenfalls keine Ähnlichkeit mehr mit dem Metronidazol-Molekül. Es treten aber im Spektrum für Oxime charakteristische Banden auf.

Tabelle 2

Charakteristische IR-Absorptionsbanden für Oxime:

Zuordnung	Normalbereich	Bemerkungen	gefunden
OH st	3450-3030	assoziiert: 3300-3100, breit	3200-3400, breit
C=N st	1695-1585	meist stark	1660, stark
N=O st	1055-870	-	1075, stark

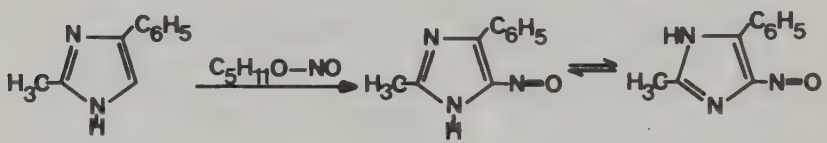
Das IR-Spektrum des isolierten Hauptbestandteils nach der Reduktion des Metronidazols zeigt gute Übereinstimmung in den für Oxime charakteristischen Absorptionsbreichen mit dem Spektrum des Cyclohexanonoxims.

---

12) Hugo Volkmann, Handbuch der Infrarot-Spektroskopie, 351, Verlag Chemie GmbH Weinheim, 1972
13) Charles J.Pouchert, The Aldrich Library of Infrared Spectra, 878

Durch die stark verbreiterte Bande von 3300-3100 cm^{-1} kann keine Aussage mehr darüber gemacht werden, ob die aliphatische $-CH_2-CH_2OH$-Gruppe des Metronidazols erhalten geblieben ist, da alkoholische Hydroxylgruppen in demselben Bereich absorbieren. Auffällig in diesem Spektrum ist die starke Bande bei 1075 cm^{-1}. Sie könnte als ν C-O-Schwingung der alkoholischen OH-Gruppe interpretiert werden, wenn die dazugehörige δ-OH-Schwingung bei 1200 cm^{-1} ebenfalls vorhanden wäre, die jedoch fehlt. Sie kann aber auch der N-O-Streckschwingung des Oxims zugeordnet werden (s.Tab.2).

Es ist bekannt, daß bei der Nitrosierung von Imidazol-Derivaten mit Amylnitrit in absolutem Ethanol Rotfärbung auftritt, z.B. mit dem folgenden Methyl-phenyl-imidazol:

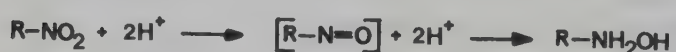


14)

ROT

Echte C-Nitrosoverbindungen entstehen dabei nur bei nicht tautomeriefähigen Heterocyclen[15].

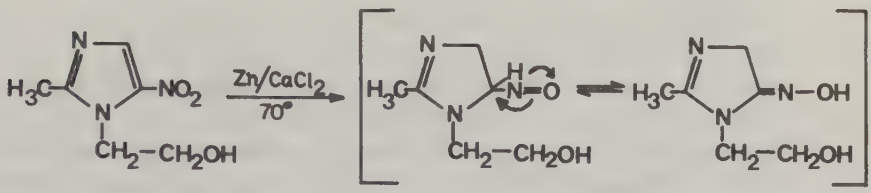
Bei der Reduktion einer Nitroverbindung im neutralen Milieu, die normalerweise als Endprodukt das Phenylhydroxylaminderivat gibt, entsteht intermediär die Nitrosoverbindung:



---

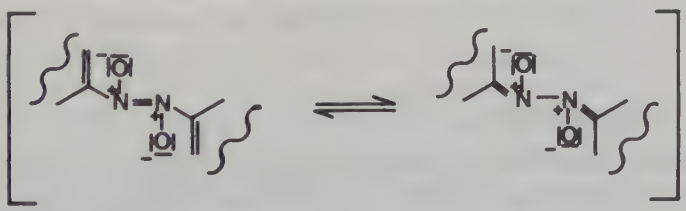
14) S.Cusmano u. M.Ruccia, G.88, 463,473(1958)
15) Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie 10/1, 4.Aufl., 1048, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1971

Bei der Reduktion des Metronidazols entsteht als Hauptprodukt höchstwahrscheinlich ein Nitrosoderivat, das sich durch das acide Wasserstoffatom in α-Stellung zur funktionellen Gruppe in das tautomere Oxim umlagert. Die Oximgruppe läßt sich im IR-Spektrum erkennen.



KETOXIM

Das Ketoxim scheint jedoch als solches nicht beständig zu sein. Anzunehmen ist einmal die Entstehung zumindest eines dimeren Produktes , auf dessen Bildung das ^{1}H-NMR-Spektrum hinweist.



Weiterhin kann es zu intramolekularen Reaktionen mit der primären Alkohol-Gruppierung kommen, die zum Zerfall des Imidazolringes und zur Polymerisierung von Molekülbruchstücken führt.
Ein auffälliges Merkmal des ^{1}H-NMR-Spektrums des mit D_2O ausgeschüttelten Oxims ist das doppelte Auftreten wesentlicher Peaks und die weitere Aufspaltung der Singuletts von Signalgruppen zu Dubletts (s.Abb. 46,47, S.106f). Gleichzeitig verschwinden die Signale ganzer Gruppen.

Im Massenspektrum konnte ein Molekülpeak nicht eindeutig ermittelt werden. Zahlreiche Peaks wurden noch zwischen 400 m/e und 500 m/e registriert (MG des postulierten Oxims: 156). Auch die für empfindliche Substanzen besonders geeignete Felddesorptions-Methode[16] zur Ermittlung des Molekülpeaks führte zu keinem eindeutigen Ergebnis.
Die Elementaranalyse ergab, daß sich der prozentuale Anteil an Stickstoff gegenüber dem Metronidazol verringert hat und der Kohlenstoff-Anteil höher geworden ist. Die Verminderung des Stickstoffgehaltes zeigt, daß sich die Struktur der nach der Reduktion entstandenen Verbindung grundlegend von der des Metronidazols unterscheidet.

Die Reduktion von Nitroheteroaromaten im neutralen Milieu wird in der Literatur kaum beschrieben. Bei der Reduktion eines Nitrochinoxalinderivates kommt es jedoch ebenfalls zur Zersetzung[17]. Das durch Säulenchromatographie isolierte Oxim wurde unter den Bedingungen der Ph.Eur. nochmals reduziert, benzoyliert und mit Eisen(III)-salz versetzt. Es trat keine Violettfärbung auf.

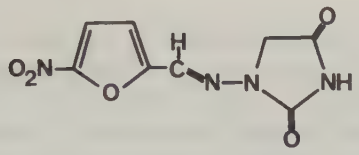
Zusammenfassung

Bei der Reduktion des Metronidazols im neutralen Milieu kommt es unter dem Einfluß des basischen Imidazolringes auf die Nitrogruppe zur Entstehung einer Nitrosoverbindung, die sich in ein Oxim umlagert. Dem ^{1}H-NMR-Spektrum sind Hinweise auf das Vorliegen einer dimeren Verbindung zu entnehmen.
Die Zunahme des Kohlenstoffgehaltes bei gleichzeitiger Verminderung des Stickstoffgehaltes kann nur mit Zerfall des Imidazolringes erklärt werden.

---

16) Angewandte Chemie 87, Heft 12, 425-460,1975
17) R.H.Mizzoni u. P.E.Spoerri, Am.Soc. 67, 1652(1945)

VI Nitrofurantoin (Furadantin^{R})



1-(5-Nitro-2-furfurylidenamino)-hydantoin

Nitrofurantoin, das in die USP XIX und BP 73 aufgenommen wurde, wird als Antiseptikum bei Harnweginfektionen angewandt. Die Substanz ist unlöslich in Wasser sowie in Ethanol, Aceton, Ether und Chloroform. In Dimethylformamid löst es sich im Verhältnis 1:15. Nitrofuran-Derivate zeigen unter den üblichen Versuchsbedingungen (Reduktion im sauren Milieu, Reduktion im neutralen Milieu) nicht die allgemeinen Reaktionen von Nitroverbindungen[18].

Bei der Durchführung der Reduktionsreaktion nach Ph.Eur. im Ethanol/Wasser-Gemisch störte die Schwerlöslichkeit des Nitrofurantoins nicht, denn nach Zugabe des Zinks entstand unter Grünfärbung eine klare Lösung. Nach dem Abkühlen ging die Farbe in leuchtendes Gelb über. Nach Zusatz von Benzoylchlorid, $FeCl_3$ und Salzsäure entstand keine violette Farblösung.

Die gleiche Reaktion wurde unter Verwendung von DMF als Lösungsmittel durchgeführt. Das DC der beiden Reaktionslösungen war gleich. Dabei zeigte sich, daß das Nitrofurantoin sich kaum umgesetzt hatte. Der durch Säulenchromatographie isolierte Hauptbestandteil nach der Reduktion ergab im Massenspektrum einen M^{+}-Peak bei m/e 238, dem Molekulargewicht des Nitrofurantoins.

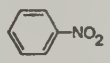
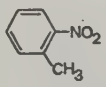
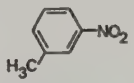
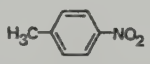
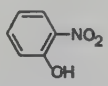
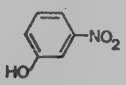
---

18) R.Pohloudek-Fabini, Th.Beyrich, Organische Analyse unter besonderer Berücksichtigung von Arzneistoffen, Akad.Verlagsges., Geest u.Portig K.-G., 237, Leipzig 1975

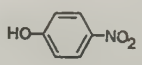
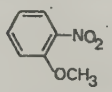
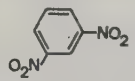
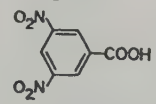
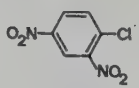
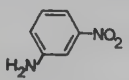
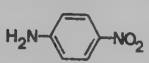
VII. Die Reduktionsreaktion in Abhängigkeit von der Konstitution der Nitroverbindung

Um eventuell Zusammenhänge zwischen der Konstitution der eingesetzten Nitroverbindung und ihrem Verhalten in der Reduktionsreaktion nach der Ph.Eur. zu erkennen, wurden sowohl einfach gebaute aromatische Nitroverbindungen sowie pharmazeutisch gebräuchliche, größere Moleküle mit einer Nitrogruppe unter den Standardbedingungen nach Ph.Eur. (s.S.[1]) reduziert. Der Reaktionsablauf ist in der folgenden Übersicht in allen Teilschritten dargestellt.

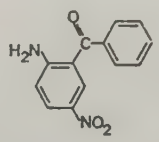
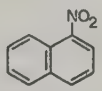
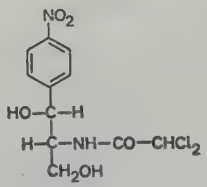
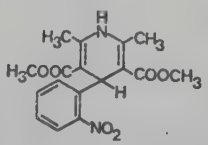
Tabelle 3

	I Substanz + Strukturformel	II pH des Ansatzes	III pH n.d.Red.; Farbe	IV pH n.Zusatz v.Natrium- acetat
1	NH_2OH	4	5,5 farblos	6
2	Nitrobenzol 	5,5	7	7
3	o-Nitrotoluol 	5,5	6 blaßgelb	6,5
4	m-Nitrotoluol 	5,5	6 trüb gelb	6,5
5	p-Nitrotoluol 	5,5	6,5 gelb	6,5
6	o-Nitrophenol 	5	7 gelb	7
7	m-Nitrophenol 	5,5	8 rotbraun	8

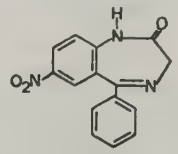
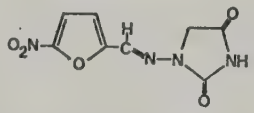
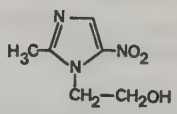
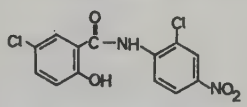
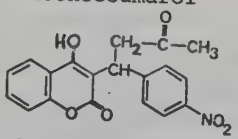
V pH n.Zusatz v. Benzoylchlorid	VI + $FeCl_3$	VII + HCl	VIII Ergebnis
1	tiefviolett	tiefviolett	+
1	dunkelbrauner Nd.	rotviolett	+
1	rotviolette, trübe Lsg.	tiefviolett	+
1	rotviolette, trübe Lsg.	tiefviolett	+
1	blaßbrauner Nd.	blaßgelb	-
2 kupferfarben	gelbbrauner Nd.	gelbbraun	-
4 olivgrün	rotbrauner Nd.	olivgrün	-

	I Substanz + Strukturformel	II pH des Ansatzes	III pH n.d.Red.; Farbe	IV pH n.Zusatz v. Natrium- acetat
8	p-Nitrophenol 	5	8 grauviolett	8
9	o-Nitroanisol 	5,5	8,5 trüb gelb	8,5
10	m-Dinitrobenzol 	5	6 braungelbe Substanz	7
11	Dinitrophenyl- essigsäure 	5	6 gelb	7
12	1-Chlor-2,4-di- nitro-benzol 	5	6 rotbraun	6,5
13	m-Nitroanilin 	5	6,5 gelb	6,5
14	p-Nitroanilin 	5	6,5 rosa	7

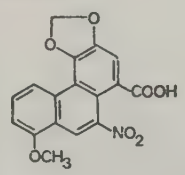
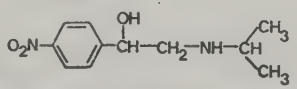
V pH n.Zusatz v. Benzoylchlorid	VI + $FeCl_3$	VII + HCl	VIII Ergebnis
4 blaßviolett	gelbgrün, Farbe verblaßt	gelb	-
4 grüngelb	dunkle, trübe Lsg.	rotviolett	+ nur bei kurzem Schütteln mit Benzoylchlorid
2	gelbbrauner Nd.	hellgelb	-
2	rotbraune, trübe Lsg.	rotviolett	+
1 grün	dunkel	grünbraun	-
2	blaßbrauner Nd.	gelb	-
5,5	blaßbrauner Nd.	hellgelb	-

	I Substanz + Strukturformel	II pH des Ansatzes	III pH n.d.Red.; Farbe	IV pH n.Zusat v. Natrium acetat
15	2-Amino-5-nitro-benzophenon 	5,5	6 dunkelgelb	6,5
16	1-Nitronaph-thalin 	5,5	6 trübgelb	7
17	Natriumnitrit $NaNO_2$	5,5	6,5 farblos	7
18	Chloramphenicol 	5,5	5 gelb	7
19	Nifedipin 	5,5	6 gelb	7

V pH n.Zusatz v. Benzoylchlorid	VI + $FeCl_3$	VII + HCl	VIII Ergebnis
1 farblos	hellgelb	hellgelb	-
4	blaßbrauner Nd.	hell, undurchsichtig	-
3	gelbe,trübe Lsg.	gelb, undurchsichtig	-
5	braunrote, trübe Lsg.	rotviolett	+
1	Abscheiden lipophiler brauner Tropfen in gelber Lsg.	hier: Zugabe von Ethanol 90% ⟶ braunviolett	+

	I Substanz + Strukturformel	II pH des Ansatzes	III pH n.d.Red.; Farbe	IV pH n.Zusatz v. Natrium- acetat
20	Nitrazepam 	4,5	6 gelb+gelber Nd.	6
21	Nitrofurantoin 	5,5	6 trüb gelb	6,5
22	Metronidazol 	5	9 rot	8,5
23	Niclosamid 	6	6 gelber Nd.	6,5
24	Acenocoumarol  20 mg Substanz	6	6 gelb	6,5

V pH n.Zusatz v. Benzoylchlorid	VI + $FeCl_3$	VII + HCl	VIII Ergebnis
4	blaßbrauner Nd.	gelb	-
5	blaßbrauner Nd.	trübgelb	-
3	trübe, gelbbraune Lsg.	gelb	-
5,5 gelbe Substanz fällt aus	keine Veränderung	trübe,gelbe Lsg.+ weiterer gelber Nd.	-
1	Abscheiden lipophiler, brauner Tropfen in gelber Lsg.	Zugabe von Ethanol 90% ⟶ rotviolett	+

	I Substanz + Strukturformel	II pH des Ansatzes	III pH n.d.Red.; Farbe	IV pH n.Zusatz v. Natrium-acetat
25	Aristolochia-säure 	5,5	6 dunkelgelb	6,5
26	Nifenalol 	5,5	7 gelb	7

Wenn nicht anders angegeben, wurden jeweils 10 mg Substanz verwendet. Die Reaktionslösungen wurden ca. 15 Minuten auf 70°C erwärmt.

V pH n.Zusatz v. Benzoylchlorid	VI + $FeCl_3$	VII + HCl	VIII Ergebnis
6	keine bleibende Veränderung	gelb	-
1	rotviolett	keine Zugabe	+

Diskussion der Ergebnisse

Die Entstehung eines violett gefärbten Hydroxamsäure-Eisen(III)-Komplexes aus einer Nitroverbindung ist im Wesentlichen von der intermediären Bildung zweier Verbindungen abhängig: von der Entstehung des Phenylhydroxylaminderivates durch Reduktion der Nitroverbindung im ersten Schritt, und von der Kondensationsreaktion des Phenylhydroxylaminderivates mit Benzoylchlorid zur Hydroxamsäure im zweiten Schritt.
Sowohl die Entstehung des Hydroxylaminderivates als auch die Bildung der Hydroxamsäure ist jeweils von mehreren Faktoren abhängig, so daß es nicht zur Entstehung des violetten Farbproduktes kommen kann, wenn die Bedingungen nur in einem Punkt nicht erfüllt sind.
Wie die Ergebnisse in Spalte VIII zeigen, entstehen violette Farbprodukte nur relativ selten.

Die Entstehung unterschiedlicher Reaktionsprodukte nach Reduktion aromatischer Nitroverbindungen ist abhängig von dem Verhältnis der Redoxpotentiale des Systems Nitroverbindung/Reduktiosmittel, wobei pH-Wert und Lösungsmitteleinflüsse sowie die Temperatur bestimmend sind.
Phenylhydroxylaminderivate entstehen unter geeigneten Bedingungen durch Reduktion von Nitroverbindungen im neutralen bis schwach sauren Milieu.
Wie in Spalte II,III und IV abzulesen ist, weisen die Lösungen des Reaktionsansatzes vor und nach der Reduktion sowie nach Zusatz von Natriumacetat allgemein die für die Durchführung der Reaktion mit Chloramphenicol erforderlichen pH-Werte auf. Ausnahmen bei den einfacher gebauten Nitroverbindungen sind, hinsichtlich des pH-Wertes, m- und p-Nitrophenol und das 2-Nitroanisol, das jedoch am Schluß trotzdem die violette Farbe gibt.

Die Zink/Calciumchlorid-Methode führt allgemein in den meisten Fällen zu geringen Ausbeuten an Phenylhydroxylaminderivat, was teilweise durch das inhomogene Reaktionsmedium bedingt sein kann. Die Erhöhung der Ausbeuten kann oftmals schon durch geringe Modifikation der Reaktion bewirkt werden (z.B. Zugabe eines Lösungsmittels, das den Eigenschaften der Substanz angepaßt ist, pH-stabilisierende Zusätze, Verwendung eines anderen Reduktionsmittels).
Daß die Menge des gebildeten Phenylhydroxylaminderivates eine entscheidende Rolle bei der Farbgebung des Hydroxamsäure-Eisen(III)-Komplexes spielt, geht auch aus der Bestimmung der Grenzkonzentrationen bei der Durchführung der Reaktion mit Chloramphenicol hervor(s.S.10): bei Verwendung von weniger als 8 mg Substanz entstand eine blaßbraune Lösung, bei Einsatz von mehr als 10 mg gab es eine tiefviolette Lösung.

Betrachtet man die Substituenten der einfacheren aromatischen Nitroverbindungen (2-16) und das Ergebnis der Reaktion, so kann man gewisse Regeln bei den Substituenteneinflüssen erkennen. Ein positives Endergebnis wird erzielt bei Verwendung von Nitrobenzol (2), o-Nitrotoluol (3), m-Nitrotoluol (4), Dinitrophenylessigsäure (11) und 2-Nitroanisol (9). Die zusätzlich zur Nitrogruppe vorhandenen Substituenten besitzen, mit Ausnahme von 2-Nitroanisol, nur induktive Effekte, während positiv-mesomere Einflüsse nicht vorhanden sind. (Die Reaktion bei Verwendung von 2-Nitroanisol ist am Schluß auch nur dann positiv, wenn 2-3 mal kurz mit Benzoylchlorid geschüttelt wird. Andernfalls scheidet sich ein hellgrünes Produkt ab, und die Lösung ist nach Zugabe von $FeCl_3$ und Salzsäure nicht violett.)
Bei den negativen Ergebnissen mit Ausnahme von p-Nitrotoluol, für das man eine positive Reaktion hätte erwarten können, enthalten die eingesetzten Moleküle in allen Fällen Substituenten, die positiv-mesomere Einflüsse auf

das aromatische System ausüben und die Elektronendichte der Nitrogruppe erhöhen (Cl, OH, NH_2). Bei Verwendung von 1-Nitronaphthalin (16), das eine analoge Reaktion zum Nitrobenzol hätte geben können, ist am Schluß kein positives Ergebnis zu verzeichnen. Dagegen können mit $NaHS/CaCl_2$ als Reduktionsmittel Ausbeuten von 80% erzielt werden[19]. Wahrscheinlich ist die Reaktivität der Nitrogruppe durch den Einfluß des basischen Naphthalingrundkörpers soweit abgeschwächt, daß das System $Zn/CaCl_2$ nicht ausreicht, um eine Reduktion zu bewirken.

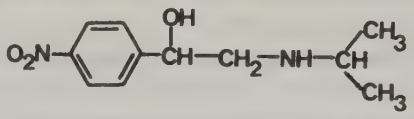
Überträgt man die Ergebnisse, die sich nach den Untersuchungen an einfacheren Nitroaromaten ergeben, auf die im letzten Teil der Tabelle aufgeführten Arzneimittel, (18-26), so lassen die Resultate dieselben Einflüsse erkennen.

Im Chloramphenicol-Molekül wird der Nitrobenzol-Grundkörper durch die n-Propyl-Seitenkette positiv-induktiv beeinflußt. Außerdem ist in dem Molekül das Verhältnis zwischen lipophilen und hydrophilen Eigenschaften ausgewogen, was seine vollständige Löslichkeit in Ethanol 50% (V/V) bewirkt. Wie die eingehenden Untersuchungen gezeigt haben (s.S. 11), verläuft die Reduktion zum Phenylhydroxylaminderivat recht vollständig, und die Entstehung der Hydroxamsäure ist auch sterisch nicht behindert. Eine weitere günstige strukturelle Gegebenheit ist das Vorhandensein der Dichloracetamido-Seitenkette im aliphatischen Teil des Moleküls, die möglicherweise ebenfalls zur Komplexbildung befähigt ist (s.S. 13). In diesem Molekül sind alle Bedingungen, die für ein positives Ergebnis notwendig sind, so günstig, daß sich das Molekül ähnlich verhält wie Nitrobenzol.

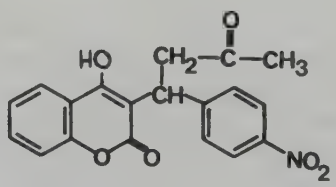
---

19) R.D.Haworth und A.Lapworth, Soc. 119, 768(1921)

Die gleichen Voraussetzungen sind im Nifenalol-Molekül (26) gegeben. Der Aromat wird in p-Stellung zur Nitrogruppe positiv-induktiv beeinflußt, und das Molekül besitzt ebenfalls hydrophile und lipophile Eigenschaften. Die Durchführung der Reaktion verläuft in allen Einzelheiten gleich wie beim Chloramphenicol.



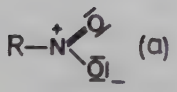
Im Nifedipin (19) ist der Nitroaromat in o-Stellung durch ein Ringsystem substituiert, das keinen +M-Effekt haben dürfte. Bei Verwendung von Nifedipin-Reinsubstanz bilden sich nach Durchführung der Reaktion und Zugabe von $FeCl_3$ lipophile dunkle Tropfen, die in dem überwiegend wäßrigen Milieu unlöslich sind. Auf Zugabe von Ethanol 90% entsteht eine homogene Lösung. Bei Verwendung von 10 mg Substanz entsteht dabei eine braunviolette, bei 20 mg eine violette Lösung.
Ähnliche Voraussetzungen liegen im Acenocoumarol-Molekül (24) vor.

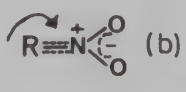


Die Nitrogruppe wird durch keine positiv-mesomeren Einflüsse beeinträchtigt. Die Reaktion verläuft analog Nifedipin und durch Zugabe von Ethanol kommt es ebenfalls zur Bildung des erwarteten Farbkomplexes. Durch den sauren pH-Wert erübrigte sich die Zugabe von Salzsäure.

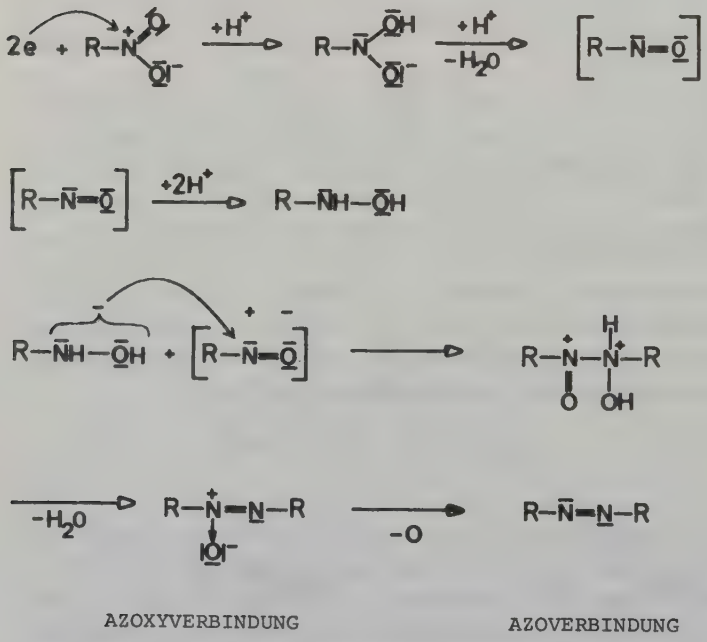
Auch hier entsteht die violette Farbe erst bei Verwendung von 20 mg Substanz.
Alle violetten Farbkomplexlösungen weisen ein UV-Absorptionsmaximum bei 515 nm auf. Die braunvioletten Lösungen (10 mg Nifedipin, 10 mg Acenocoumarol) besitzen in diesem Spektralbereich nur eine Schulter. Bei Verwendung größerer Konzentrationen dieser Substanzen weisen diese Lösungen wieder das Maximum bei 515 nm auf.
Aus diesen beiden Ergebnissen läßt sich die Bedingung ableiten, daß das Lösungsmittel am Ende der Reaktion den Eigenschaften des Hydroxamsäure-Eisen(III)-Komplexes angepaßt sein muß.

Zwei Moleküle, die sich bei der Reaktion ebenfalls recht ähnlich verhalten, sind Nitrazepam (20) und Niclosamid (23). Bei keiner der untersuchten einfacheren Nitroverbindungen, die eine Aminogruppe im Molekül enthalten, kam es zu einem positiven Ergebnis.
Nitrazepam (20) ist ein Benzodiazepinderivat und trägt in p-Stellung zur Nitrogruppe einen basischen Stickstoff. Insgesamt wird das Molekül durch die freien Elektronenpaare zweier N-Atome positiv-mesomer beeinflußt.
Im Chloramphenicol-Molekül, dessen Nitrogruppe keinen positiv-mesomeren Einflüssen unterliegt, entspricht die Ladungsverteilung innerhalb der funktionellen Gruppen wohl überwiegend dem Grundzustand (a). Enthält ein Molekül zusätzlich Elektronendonatoren, so verändert sich auch die Elektronendichte der funktionellen Gruppe (b):

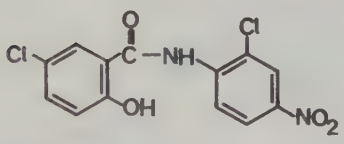

(a)


(b)

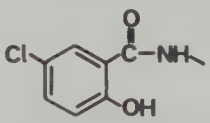
Die Zustände a und b erinnern formal an die Carbonylverbindungen, die dementsprechend beide unterschiedlich reaktiv sind (a ≙ COOH-Gruppe, b ≙ Carboxylatanion). Form b ist elektronenreicher, energieärmer und infolgedessen reaktionsträger.
Bei der Reduktion entsteht das Phenylhydroxylaminderivat, das ebenfalls den positiv-mesomeren Einflüssen ausgesetzt ist wie die Nitroverbindung und daher nicht als stabiles Endprodukt beständig ist, sondern sich bevorzugt in einer nucleophilen Reaktion mit dem intermediär entstehenden Nitrosoderivat zur Azoxy- bzw. Azoverbindung umsetzt.



Die Reaktion ist auch deswegen begünstigt, weil sich ein besonders energiearmes Endprodukt durch Verlängerung des konjugierten Systems ausbildet, und das Produkt in dem vorliegenden wäßrigen Milieu unlöslich ist. Das Nitrazepam ist also aus einem relativ energiearmen Zustand in eine andere, noch energieärmere Stufe übergegangen.



Im Niclosamid-Molekül (23) ist der Nitroaromat durch die Substituenten Cl und den Rest substituiert.

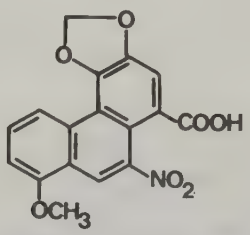


Beide besitzen verhältnismäßig starke +M-Effekte und wirken im Niclosamid additiv auf die Reaktivität der Nitrogruppe ein. Außerdem besitzt der Aromat im Amidrest weitere Substituenten mit +M-Effekt (Cl, OH);
[+M-Effekt: -OR < $-NR_2$; -Br < -Cl] 20)
Bei der Reduktion kommt es daher ebenfalls zur Bildung eines gelben Niederschlages, und die Reaktion gelingt nicht, obwohl der Stickstoff in p-Stellung zur Nitrogruppe keine basischen Eigenschaften besitzt.

---

20) Organikum, 12.Aufl., 161, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1973

Metronidazol (22) und Nitrofurantoin (21) wurden bereits ausführlich besprochen. Nitrofuranderivate nehmen in der Reihe der Nitroheteroaromaten in ihrer Reaktivität offensichtlich eine Sonderstellung ein, während die Bildung von Oximen aus stickstoffhaltigen Fünfringheterocyclen bei entsprechender Disposition besonders begünstigt zu sein scheint[21].



Aristolochiasäure (25) gibt unter den Bedingungen nach Ph.Eur. ebenfalls keine positive Reaktion. Der basische Phenanthrengrundkörper ist wahrscheinlich ebenso für das negative Ergebnis verantwortlich wie beim 1-Nitronaphthalin (16).

Faßt man die bisher erzielten Ergebnisse zusammen, so zeigt sich, daß die Reaktion nur unter bestimmten Bedingungen gelingt:

a) Das Reduktionspotential des Reduktionsmittels muß auf das zu reduzierende System abgestimmt sein
b) Die Reaktivität des Nitroaromaten darf nicht durch zu starke und einseitige induktive Effekte eingeschränkt werden. [unsymmetrische Substitution: m-Dinitrobenzol (10), Ergebnis: negativ; symmetrische Substitution: 3,5-Dinitrophenylessigsäure (11), Ergebnis: positiv; Ausgeglichenheit der Substituenteneinflüsse: Chloramphenicol (18), Ergebnis: positiv]

---

21) Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie 10/1, 4.Aufl., 1043, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1971

Das Molekül darf keine π-Elektronendonatoren enthalten (Heteroaromaten, Halogene, Alkohole, Amine)

c) Die Wahl des Lösungsmittels muß den Eigenschaften der Verbindung angepaßt sein (Niclosamid ist wasserunlöslich).

d) Die Lösung muß die für die jeweiligen Reaktionsschritte erforderlichen pH-Werte aufweisen.

e) Die Reaktion darf in beiden Schritten nicht sterisch behindert sein.

f) Die quantitative Ausbeute an Phenylhydroxylaminderivat muß möglichst groß sein, um ein violettes oder rotviolettes Farbprodukt zu erhalten und muß in dem Reaktionsmedium löslich sein.

g) Der Hydroxamsäure-Eisen(III)-Komplex muß in der Reaktionslösung, die am Schluß vorliegt, löslich sein (Acenocoumarol, Nifedipin)

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde weiter versucht, unter Variation einzelner Bedingungen, mit den Arzneimittel-Molekülen, die kein positives Ergebnis gezeigt hatten, die Reaktion doch zu erzwingen.

Dazu wurde die Reaktion einmal mit Zink in ethanolischer $CaCl_2$-Lösung durchgeführt. In keinem Fall konnte ein positives Ergebnis erzielt werden. Die Reduktion mit Zink und Ammoniumchlorid führte ebenfalls zu keiner positiven Reaktion.
Durch Reduktion mit Natriumhydrogensulfid und Calciumchlorid sollen der Literatur nach im allgemeinen bessere Ausbeuten erzielt werden.
Zur Durchführung der Reaktion wurden jeweils 20 mg 1-Nitronaphthalin (16), Nitrazepam (20), Nitrofurantoin (21), Metronidazol (22), Niclosamid (23) und Aristolochiasäure (25) reduziert. Die Lösung betrug nach der Reduktion pH 10 und nach Zusatz von Benzoylchlorid pH 6. In Abhängigkeit von der Basizität und der Wasserunlöslichkeit der verwendeten Substanzen entstanden zunächst in dem alkalischen

Milieu überwiegend gelbe Niederschläge, die sich bei längerem Erwärmen wieder auflösten. Nur bei Verwendung von Nitrofurantoin (21) bildete sich ein dichter dunkelbrauner Niederschlag in rotbrauner Lösung.
Nach Zugabe von Benzoylchlorid (pH 6) und $FeCl_3$ kam es bei 1-Nitronaphthalin (16) und Nitrazepam (20) zur Ausfällung dunkler Produkte, die nur durch Zusatz von Chloroform in Lösung gingen. Die Chloroformphase war im Falle des 1-Nitronaphthalins dunkelbraunrot, beim Nitrazepam bräunlich gefärbt. (Dieses Ergebnis bestätigt die von Haworth erreichten Ausbeuten von 80%, s.S.53).
Es konnte also auch unter variierten Bedingungen kein eindeutig positives Ergebnis erzielt werden. Es könnte sein, daß bei entsprechend hohem Einsatz an Ausgangssubstanz bei den stark lipophilen Verbindungen durch Zusatz von Chloroform am Schluß ebenfalls eine violette Lösung entstehen würde. Durch die geringe Empfindlichkeit der Reaktion in diesem Fall wäre sie jedoch für eine Identitätsprüfung nicht mehr geeignet.
Aus diesem letzten Ergebnis geht hervor, daß die unter g) aufgeführte Bedingung (s.S.59) noch dahingehend eingeschränkt werden muß, daß der entstehende Hydroxamsäure-Eisen(III)-Komplex überwiegend wasserlöslich sein muß, damit die charakteristische rotviolette Farbe entsteht.

Alle Bedingungen, die zur Erzielung eines positiven Endergebnisses notwendig sind, sind nur im Falle des Chloramphenicol- und des Nifenalol-Moleküls in optimaler Weise erfüllt, so daß die Reaktion nach Ph.Eur. nicht allgemein verwendbar ist. Da die Zahl der komplizierten, nitroaromatischen Verbindungen, die für eine positive Bestätigung dieses Ergebnisses herangezogen werden kann, nicht groß ist, konnte nur noch mit zwei weiteren Arzneimittel-Molekülen [Nifedipin (19), Acenocoumarol (24)] , unter Variation einer Bedingung am Schluß (g), ein positives Ergebnis erzielt werden.

VIII Zusammenfassung

Die Nachweisreaktion aromatischer Nitrogruppen, wie sie für Chloramphenicol als Identitätsreaktion in der Ph. Eur. vorgeschrieben ist, sollte eingehend auf ihre allgemeine Verwendbarkeit untersucht werden. Danach wird die Nitrogruppe mit Zink in Gegenwart von Calciumchlorid reduziert, das entstandene Phenylhydroxylaminderivat mit Benzoylchlorid zur N-substituierten Hydroxamsäure umgesetzt und als violetter Eisen(III)-Komplex nachgewiesen. Um Aussagen über die allgemeine Anwendbarkeit dieser Methode machen zu können, wurde die Reaktion mit unterschiedlich substituierten Nitrobenzolderivaten durchgeführt. Außerdem wurde das Verhalten stickstoff- und sauerstoffhaltiger Nitroheteroaromaten untersucht, und die Struktur der nach der Reduktion entstandenen Reaktionsprodukte nach Möglichkeit aufgeklärt.

Die Entstehung eines violett gefärbten Hydroxamsäure-Eisen(III)-Komplexes aus einer Nitroverbindung ist im Wesentlichen von zwei Reaktionsschritten abhängig: erstens von der Entstehung des Phenylhydroxylaminderivates durch Reduktion der Nitroverbindung und zweitens von der Kondensationsreaktion des Phenylhydroxylaminderivates mit Benzoylchlorid zur N-substituierten Hydroxamsäure. Sowohl die Entstehung des Hydroxylaminderivates als auch die Bildung der Hydroxamsäure sind jeweils von mehreren Faktoren abhängig, so daß es nicht zur Entstehung des violetten Farbproduktes kommen kann, wenn die Bedingungen nur zum Teil erfüllt sind.
Die Entstehung unterschiedlicher Reaktionsprodukte nach Reduktion aromatischer Nitroverbindungen ist abhängig von dem Verhältnis der Redoxpotentiale des Systems Nitroverbindung/Reduktionsmittel, wobei pH-Wert und Lösungsmitteleinflüsse sowie die Temperatur bestimmend sind.

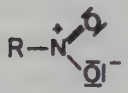
Bei der Reduktion unter den gegebenen Bedingungen von einfach und mehrfach substituierten Nitrobenzolderivaten kann man einige Regeln bei den Substituenteneinflüssen erkennen. Die Reaktion bei den einfach substituierten Nitroverbindungen gelingt meistens, wenn keine positiv-mesomeren Substituenteneinflüsse vorliegen.
Bei mehrfach substituierten Verbindungen führt die Reaktion nur dann zu einem positiven Ergebnis, wenn der Aromat symmetrisch substituiert ist (positiv: z.B.3,5-Dinitrophenylessigsäure; negativ: 1,3-Dinitrobenzol).
Die Reaktion gelingt nicht, wenn einer der Substituenten einen +M-Effekt auf das aromatische System ausübt und damit die Elektronendichte der Nitrogruppe erhöht (z.B. $-NH_2$, $-NR_{(2)}$, -OH, -OR, Halogene). Für das negative Ergebnis nach der Reduktion von 1-Nitronaphthalin und Aristolochiasäure ist vermutlich ebenfalls die Basizität des Ringsystems verantwortlich.

Die Reaktion verläuft besonders glatt nur mit Chloramphenicol und Nifenalol. Unter Zusatz von Ethanol am Schluß der Reaktion fällt sie auch bei der Nifedipin-Reinsubstanz und Acenocoumarol positiv aus. Die Benzoylierung des Hydroxylaminderivates zur Hydroxamsäure darf sterisch nicht behindert sein. Außerdem muß die Hydroxamsäure in der überwiegend wäßrigen Reaktionslösung löslich sein. Bei stark lipophilen Molekülen kommt es nach Zusatz des Eisen(III)-chlorids zum Ausfallen lipophiler rotbrauner Tropfen, die auf Zugabe von Ethanol mit rotvioletter Farbe in Lösung gehen (Acenocoumarol, Nifedipin-Reinsubstanz).
Im Chloramphenicol-Molekül wird der Nitrobenzol-Grundkörper durch die n-Propyl-Seitenkette positiv-induktiv beeinflußt. Außerdem ist in dem Molekül das Verhältnis zwischen lipophilen und hydrophilen Eigenschaften ausgewogen, was seine vollständige Löslichkeit in Ethanol 50% bewirkt. Wie die Untersuchungen gezeigt haben, verläuft die Reduktion zum Phenylhydroxylaminderivat recht vollständig,

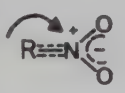
und die Entstehung der Hydroxamsäure ist auch sterisch nicht behindert. Eine weitere günstige strukturelle Gegebenheit ist das Vorhandensein der Dichloracetamido-Seitenkette im aliphatischen Teil des Moleküls, die möglicherweise ebenfalls zur Komplexbildung beiträgt. In diesem Molekül sind alle Bedingungen, die für ein positives Ergebnis notwendig sind so günstig, daß sich das Molekül ähnlich verhält wie das einfache Nitrobenzol. Der Zusatz von Anilin zum Chloramphenicol-Ansatz führte zu keiner Abweichung im Reaktionsablauf gegenüber den Standardbedingungen. Damit wird gezeigt, daß die Anwesenheit basischen Stickstoffs grundsätzlich nicht stört.

Bei der Durchführung der Reaktion mit den Nitroheteroaromaten kam es in keinem Fall zur Entstehung einer violetten Farblösung (Nitrazepam, Metronidazol, Nitrofurantoin). Nitrofurantoin (Nitrofuranderivat) wurde überhaupt nicht umgesetzt. Aus Nitrazepam (Benzodiazepin) entstand ein Gemisch der Azoxy- und der Azoverbindung, aus Metronidazol (Nitroimidazolderivat) eine Nitrosoverbindung, die sich in ein Oxim umlagerte.

Unterliegt eine aromatisch gebundene Nitrogruppe keinem +M-Effekt, so kann man davon ausgehen, daß die Ladungsverteilung innerhalb der funktionellen Gruppe wohl überwiegend dem Grundzustand entspricht (a). Enthält ein Molekül zusätzlich Elektronendonatoren, so verändert sich auch die Elektronendichte der Nitrogruppe (b).



(a)



(b)

Form b ist elektronenreicher, energieärmer und reaktionsträger.

Daher kommt es beim Nitrazepam noch zur Entstehung eines Phenylhydroxylaminderivates, das aber nicht als stabiles Endprodukt beständig ist, sondern sich bevorzugt mit dem intermediär entstehenden Nitrosoderivat zur Azoxy- bzw. Azoverbindung umsetzt. Die Reaktion ist auch deswegen begünstigt, weil das Produkt in dem vorliegenden wäßrigen Milieu unlöslich ist. Gleiches Verhalten zeigt Niclosamid.

Bei der Reduktion des Metronidazols, dessen Nitrogruppe noch stärkeren basischen Einflüssen unterliegt als Nitrazepam, führt die Reduktion nur bis zur Stufe der Nitrosoverbindung, die sich in ein Oxim umlagert. Das Oxim konnte nicht zum Hydroxylamin reduziert werden. So war auch die Benzoylierung und die Eisen(III)-Reaktion nicht möglich.

Allgemein läßt sich sagen, daß die Identitätsreaktion der Ph.Eur. zur Reduktion von Nitrogruppen über die Hydroxylaminstufe nur mit Nitrobenzolderivaten, aber nicht mit Heteroaromaten durchführbar ist. Sie gelingt auch nur dann, wenn die Reaktivität der Nitrogruppe nicht durch Substituenten mit +M-Effekten beeinträchtigt wird. Der entstandene Hydroxamsäure-Eisen(III)-Komplex muß gut wasserlöslich sein, damit eine rotviolette Farblösung entsteht.
Durch Verwendung anderer Reduktionsmittel (z.B. Na_2S) können manchmal bei lipophilen Molekülen höhere Ausbeuten an Phenylhydroxylaminderivat erzielt werden. In diesen Fällen muß man jedoch größere Mengen des Ausgangsmoleküls einsetzen, so daß durch die geringe Empfindlichkeit der Reaktion sie für eine Identitätsprüfung nicht mehr geeignet ist.

IX. Beschreibung der Versuche

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit der Schmelzpunktsapparatur nach Linström ermittelt und sind unkorrigiert angegeben.

Elektronenspektren

Die Messungen wurden mit dem Beckman-Spektralphotometer DB-GT in Quarzküvetten durchgeführt. Die Lösungsmittel sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

Infrarotspektren

Die Aufnahmen erfolgten mit den Beckman-Spektrometern AccuLab T.M.2 und IR 20, A-X mit Hilfe von KBr-Preßlingen.

Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit einem Varian-Gerät Typ CH-7 aufgenommen.

^{1}H-NMR-Spektren

Die Aufnahme der Kernresonanzspektren erfolgte in den Geräten Varian A-60 und Bruker WP-80. Als Referenzsignal diente TMS.

Dünnschichtchromatographie

Die DC-Analysen wurden mit DC-Fertigplatten der Firma Merck, Darmstadt, augeführt. Plattenbeschichtung: Kieselgel F 254. Fließmittel und Detektion sind bei der jeweiligen Versuchsbeschreibung angegeben.

Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium Ilse Beetz, Kronach/Ofr. durchgeführt.

N-Phenylhydroxylamin

25 g Ammoniumchlorid, 800 ml Wasser und 50 g Nitrobenzol werden in einem Becherglas unter starkem Rühren innerhalb von 15 Minuten mit 65 g Zinkstaub versetzt. Die Temperatur steigt dabei auf 60°-65°C. Nach Erreichen dieser Temperatur wird die heiße Lösung abgesaugt und das zurückbleibende Zinkoxid mit 100 ml Wasser gewaschen.
Das Filtrat wird mit 300 g Natriumchlorid versetzt und mit Eis/Natriumchlorid-Mischung auf 0°C abgekühlt. Nachdem die Temperatur 40 Minuten auf 0° gehalten wurde, kann abgesaugt werden. Zur Reinigung löst man in 100 ml heißem Benzol, filtriert und gibt 100 ml Petrolether dazu. Nach 2-3stündigem Aufbewahren im Kühlschrank wird abgesaugt. Farblose, seidenglänzende Kristalle, die sich in Wasser, Ethanol und Ether lösen. Identitätsnachweis durch Reduktion mit Fehling'scher Lösung.
Schmp.: 80°C (Lit.: 82°C).

Nitrosobenzol

Eine Lösung von 7,5 g NH_4Cl in 1/4 l Wasser werden zusammen mit 12,5 ml Nitrobenzol kräftig gerührt und innerhalb von fünf Minuten 18,6 g Zn-Staub in kleinen Anteilen hinzugefügt. Kurz darauf setzt unter Temperaturerhöhung die Reaktion ein. Bei Erreichen einer Temperatur von 65°C muß sie durch Eiskühlung auf 50°-55° gesenkt werden. 20 Minuten nach Zugabe des Zinks wird die Lösung filtriert und der Zinkoxid-Rückstand mit kochendem Wasser gewaschen. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und anschließend unter Kühlung auf 0°--2°,sofort die Oxidation zu Nitrosobenzol durchgeführt.
Dazu werden unter Rühren 37,5 ml konz.H_2SO_4 zugefügt und auf -5°C abgekühlt. Danach wird schnell eine ebenfalls auf -5°C abgekühlte Lösung von 8,5 g $Na_2Cr_2O_7$ in 25 ml H_2O dazugegeben. Nach zwei bis drei Minuten wird der Nitrosobenzol-Niederschlag in einem Büchner-Trichter gesammelt

und mit Wasser gewaschen. Das rohe Nitrosobenzol wird dann der Wasserdampfdestillation unterworfen und das Destillat in einem Kolben unter Eiskühlung gesammelt. Der Nitrosobenzol-Niederschlag wird in einem Mörser zerrieben und so lange mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser nicht mehr braun ist. Anschließend wird unter guter Kühlung zweimal aus einer kleinen Menge Ethanol umkristallisiert und über $CaCl_2$ getrocknet.
Es entstehen farblose Kristalle vom Schmp. 68°, die sich beim Lösen, Schmelzen und Verdampfen grün färben. In der festen, farblosen Form liegt eine bimolekulare Verbindung vor.

Hydroxylamin

Die Lösung von 10 mg Substanz (pH 4) zeigte nach Durchführung der Reaktion und Zusatz von 100 bis 200 mg wasserfreiem Natriumacetat R einen pH von 6 und besaß am Schluß tiefviolette Farbe (Abb.15). Das Absorptionsmaximum der Lösung lag wiederum bei 515 nm.

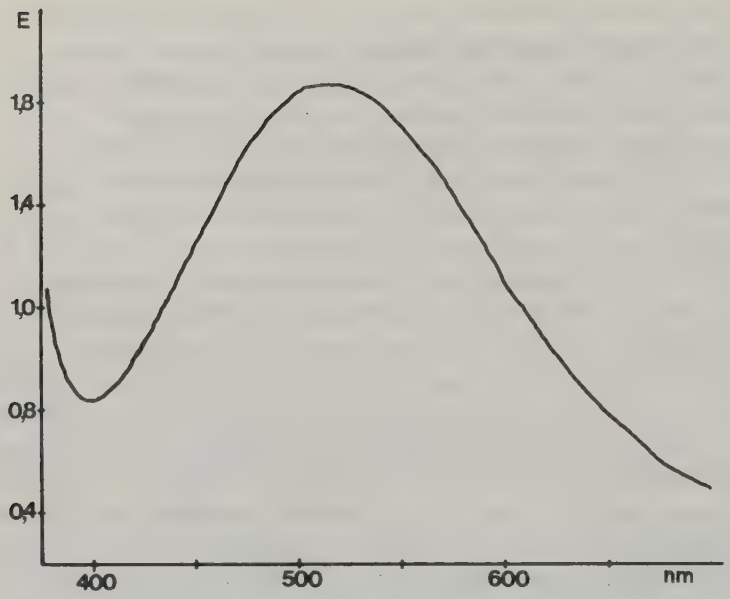


Abb.15: Elektronenspektrum des Farbproduktes mit Hydroxylamin analog Chloramphenicol Ph.Eur. + Benzoylchlorid
c = 4 mg/10 ml

Statt Benzoylchlorid wurde Acetylchlorid zugegeben. Der pH-Wert des Ansatzes betrug 4, und nach Zusatz von $FeCl_3$ entstand eine klare, hellrotbraune Lösung. Durch den sauren pH-Wert erübrigte sich der Zusatz von HCl. Außerdem verblaßte die Farbe bei stärkerem Ansäuern vollständig.

Mikrobiologische Wirksamkeit zeigt nur das natürlich vorkommende D-threo-Chloramphenicol. Bei den zahlreichen Synthesen[22] entstehen aufgrund der Asymmetrie der beiden

---

22) M.Pailer, Fortschr.Chem.Org.Naturst., Hrsg. L. Zechmeister, 18 Bd., Springer-Verlag, Wien 1960

C-Atome C_1 und C_2 zwei inaktive Formen und vier Spiegelbildisomere, und zwar D-threo (CAHN-INGOLD: 1R, 2R), L-threo (1S, 2S), D-erythro (1S, 2R) und L-erythro (1R, 2S).

Identifizierung der weißen, kristallinen Substanz nach Zusatz von Benzoylchlorid zum Reaktionsgemisch.

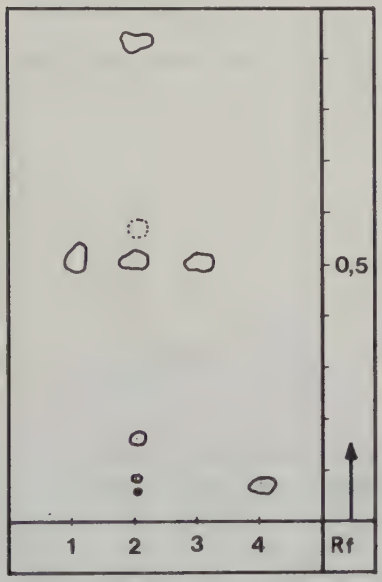


Abb.16:
Schematisches DC der weißen, kristallinen Substanz nach Zusatz von Benzoylchlorid zum Reaktionsgemisch

Fließmittel: Benzol/Ameisensäure/Ameisensäureethylester 17+1+2

Detektion: UV-Licht

1 = Benzoesäure
2 = Weiße, kristalline Substanz, ausgewaschen, in H_2O aufgenommen, angesäuert, mit Ether ausgeschüttelt, getrocknet, eingedampft
3 = Bestandteile der in der Monographie angegebenen Reaktionspartner mit Ausnahme von Chloramphenicol
4 = Chloramphenicol

Wie aus Abb.16 hervorgeht, zeigen Phase 1 und 2 beim Rf-Wert 0,5 Flecke, die dem Rf-Wert der Benzoesäure entsprechen.

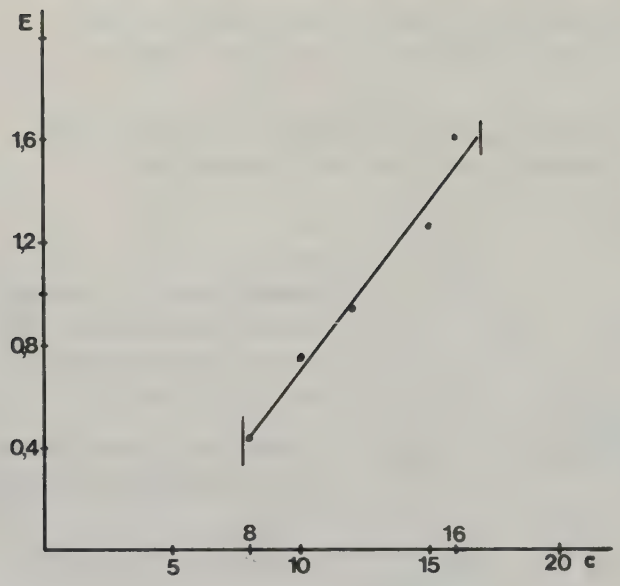


Abb.17: Farbreaktion des Chloramphenicols nach Ph.Eur. mit Konzentrationen zwischen 8 und 16 mg/10 ml Lsg.
c = mg/10 ml Lösung

Gehaltsbestimmung des Chloramphenicols nach DAB 7

0,100 g Substanz, genau gewogen, werden in Wasser zu 100,0 ml gelöst. 5,00 ml dieser Lösung werden zu 250,0 ml verdünnt. Die Extinktion dieser Lösung wird in einer Schichtdicke von 1,000 cm bei 278 nm gemessen. $E^{1\%}_{1cm}$ muß mindestens 289 und darf höchstens 307 betragen, entsprechend einem Gehalt von 97,0 bis 103,0% Chloramphenicol, berechnet auf die getrocknete Substanz.

$$E^{1\%}_{1cm} = \frac{E}{c' \cdot d}$$

c' = Konzentration des gelösten Stoffes in g/100 ml Lösung.

Bei der Gehaltsbestimmung nach dem DAB 7 ergab sich bei 275 nm eine Extinktion von 0,59 entsprechend einer Einwaage von 0,2 mg Chloramphenicol/10 ml Lösung.
Nach der Reduktion der Probe von 10 mg Chloramphenicol wurde bei 275 nm ein Extinktionswert von 0,06 abgelesen.

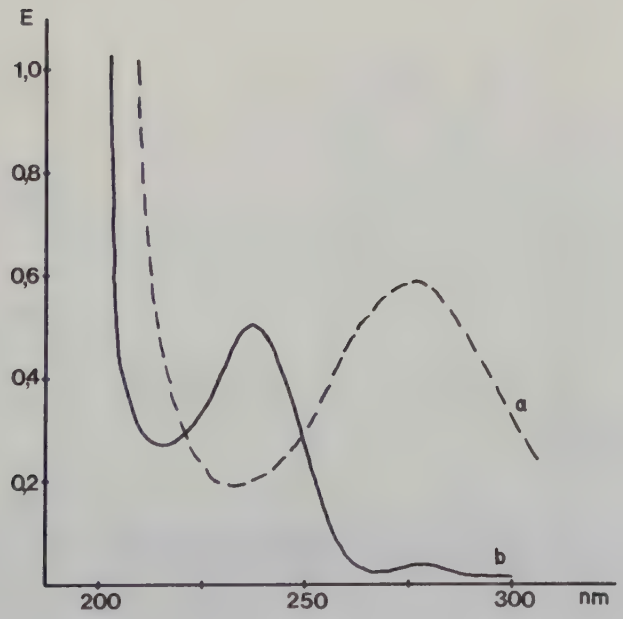


Abb.18: Elektronenspektren
a) des Chloramphenicols, c = 0,2 mg/10 ml Lösung
b) des zum Hydroxylaminderivat reduzierten Chloramphenicolansatzes

Chloramphenicol hat ein Maximum bei 275 nm (E = 0,59 bei der gegebenen Konzentration); der zum Hydroxylaminderivat reduzierte Chloramphenicolansatz hat bei 275 nm eine Extinktion von 0,06, die auf restliches Chloramphenicol zurückzuführen ist. Auch Phenylhydroxylamin hat bei 275 nm das Absorptionsmaximum. Die quantitative Bestimmung des Chloramphenicols ist also praktisch möglich, eine Aussage über die Vollständigkeit der Reduktion nicht.

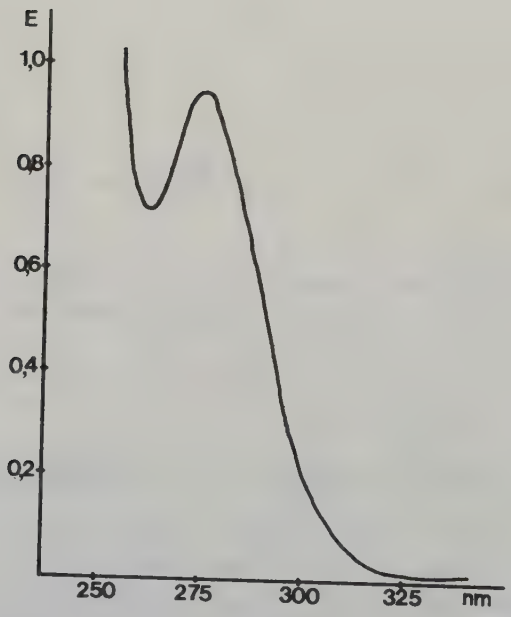


Abb.19: Elektronenspektrum des authentischen Phenylhydroxylamins, c = 8 mg/10 ml Ethanol.

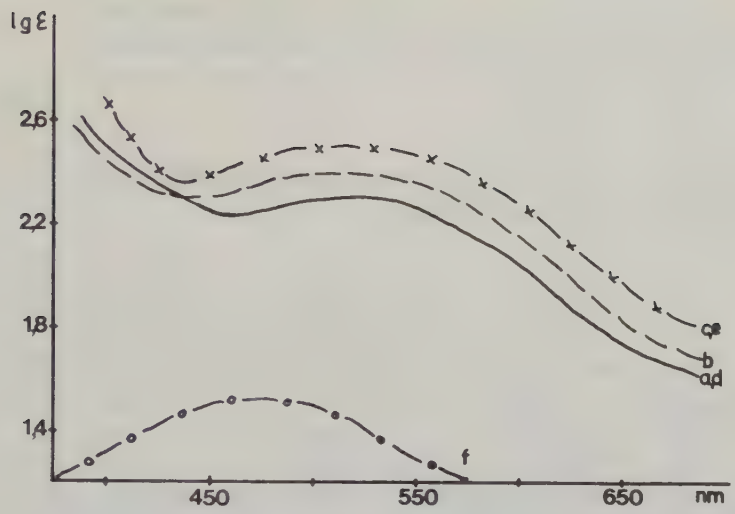


Abb.20: Elektronenspektren der Farblösung nach Ph.Eur. mit Chloramphenicol und seinen Analogen

a = Chloramphenicol	c = 1,0 g/l	+ Benzoylchlorid
b = "	c = 1,2 g/l	"
c = "	c = 1,6 g/l	"
d = Nitrobenzol	c = 0,9 g/l	"
e = Hydroxylamin	c = 0,4 g/l	"
f = "	c = 1,0 g/l	+ Acetylchlorid

Wie die Elektronenspektren mit steigenden Konzentrationen an Chloramphenicol (a,b,c) zeigen, verläuft die chemische Umsetzung offensichtlich bei höherer Konzentration vollständiger. Eine andere Ursache für die voneinander abweichenden lg ε-Werte der drei Kurven kann der hohe Meßbereich sein (E zwischen 0,6 und 1,6), der zu ungenauen Extinktionswerten führt. Da aber die Messung nur bei Chlor-

amphenicol-Konzentrationen zwischen 8 mg und 16 mg/10 ml Lösung durchführbar sind, und die Extinktionswerte der Maxima in diesem Meßbereich liegen, kann diese Ursache als mögliche Fehlerquelle nicht ausgeschaltet werden.

Tabelle 4

Vergleich der molaren Extinktionen des Chloramphenicols, Nitrobenzols und Hydroxylamins.

	1	2	3
	Mol.Masse	Molarität d.hergestellten Lsg.	Molare Extinktion ε
Chloramphenicol	323,1	$3 \cdot 10^{-3}$	200
		$3{,}7 \cdot 10^{-3}$	256
		$4{,}9 \cdot 10^{-3}$	326
Nitrobenzol	123,1	$7{,}3 \cdot 10^{-3}$	184
Hydroxylamin	69,5	$5{,}7 \cdot 10^{-3}$ (+Benzoylchlorid)	329
		$1{,}4 \cdot 10^{-3}$ (+Acetylchlorid)	33

Die spektralphotometrische Messung der Farblösungen mit Chloramphenicol, sowie mit Nitrobenzol und Hydroxylamin anstelle von Chloramphenicol, ergab jeweils ein Absorptionsmaximum im Bereich von 515 nm. Da unterschiedliche Konzentrationen notwendig sind, um die Extinktionsmaxima ablesen zu können, wurde als Vergleichsgrundlage die Extinktion der jeweiligen molaren Lösung herangezogen. Die molare Extinktion müßte für alle verwendeten Substanzen annähernd gleich sein. Wie Spalte 3 der oben aufgeführten Tabelle zeigt, liegen die Werte zwischen 180 und 330. Bei Verwendung von Hydroxylamin mit Acetylchlorid weicht der Extinktionswert der molaren Lösung um eine Zehnerpotenz von den anderen Werten ab.

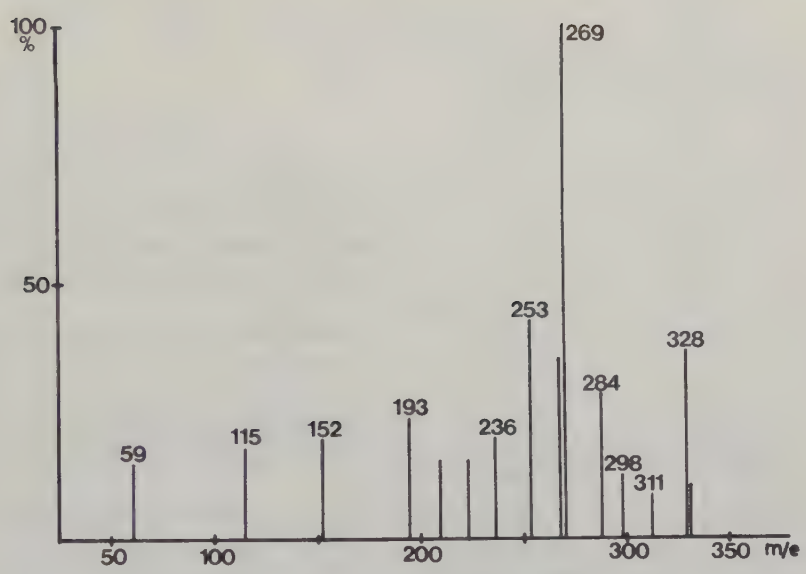


Abb.21: Massenspektrum des Nitroso-Derivates nach Behandlung des Nifedipins mit 0,1N-HCl[23)]

23) Ausführliche Diskussion des MS s. S.Ebel, H.Schütz, A.Hornitschek, Arzneim.-Forsch./Drug Res. 28(II), Heft 12, 2188-2193, 1978

Elementaranalyse der gelben Kristalle nach HCl-Spaltung von Nitrazepam:

$C_{13}H_{10}N_2O_3$ (242,2): Ber.: C 64,41 H 4,12 N 11,56 O 19,81
Gef.: C 64,16 H 4,05 N 11,36 O 20,23

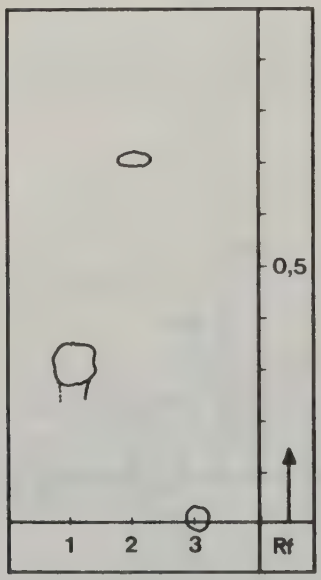


Abb.22:
Schematisches DC der gelben kristallinen Substanz nach HCl-Spaltung von Nitrazepam

Fließmittel: Chloroform/ Diethylamin 9+1

Detektion: UV-Licht

1 = Nitrazepam
2 = Gelbe, kristalline Substanz
3 = Flüssigkeitsrückstand

Die gelben Kristalle, die nach dem Erhitzen von Nitrazepam mit Salzsäure entstehen, sind dünnschichtchromatographisch einheitlich.

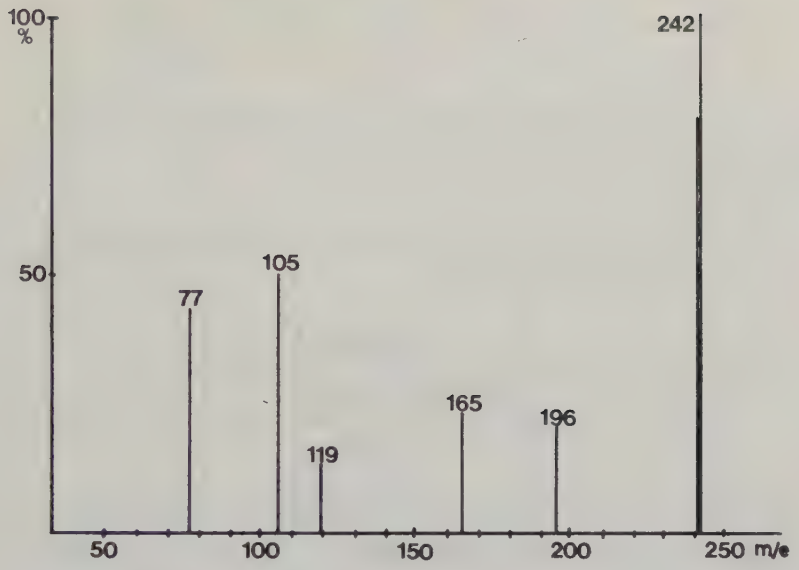


Abb.23: Massenspektrum der gelben, kristallinen Substanz
Probe: 75°C
Ionenquelle: 250°C, 70 eV, Direkteinlaß

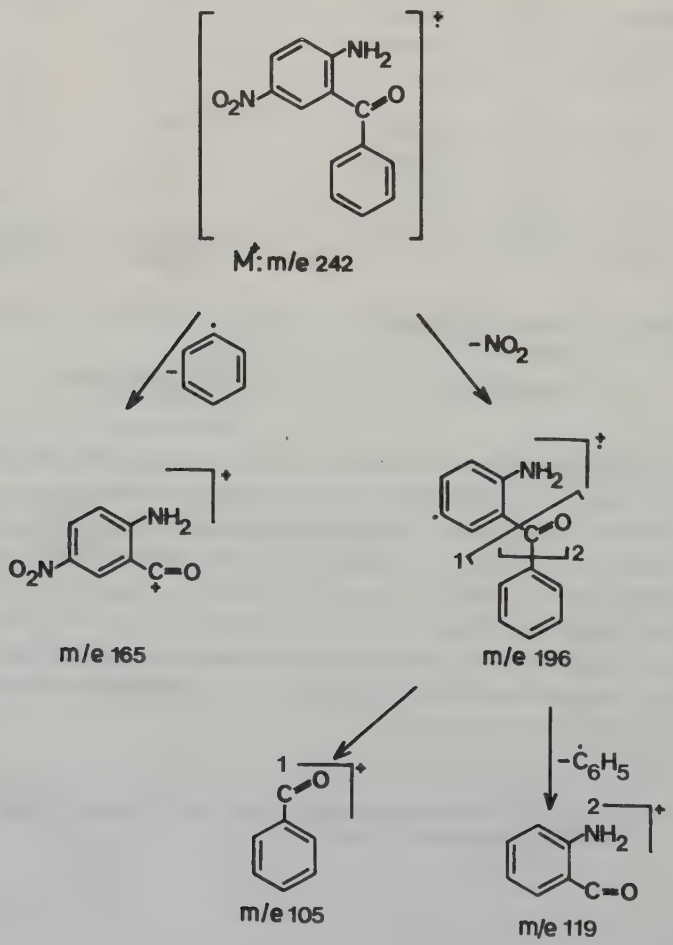
Im Massenspektrum erscheint bei m/e 242 der Molekülpeak, wie das der Molmasse des 2-Amino-5-nitro-benzophenons entspricht. Der Zerfall aromatischer Nitroverbindungen, die nicht zusätzlich mit anderen leicht eliminierbaren Gruppen substituiert sind, verläuft hauptsächlich unter Verlust von $^{\cdot}NO_2$ (m/e 196).
Daneben ist auch eine Umlagerung des Molekülions zum Ester der salpetrigen Säure möglich, der dann durch Abspaltung von NO und CO zerfällt[24].

---

24) H.Kienitz, Massenspektrometrie 476, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. 1968.

In Gegenwart anderer leicht spaltbarer Substituenten, wie hier einer COR-Gruppe, entstehen weiterhin Bruchstücke durch Verlust von $^{\bullet}R$ (m/e 165 und m/e 119) bzw. $COR^{\bullet}$ (m/e 105).
Das im Massenspektrum erkennbare Endabbauprodukt ist das bei m/e 77 auftretende Phenylradikal.

Mögliches Zerfallsschema des 2-Amino-5-nitro-benzophenons bei der Massenspektrometrie:



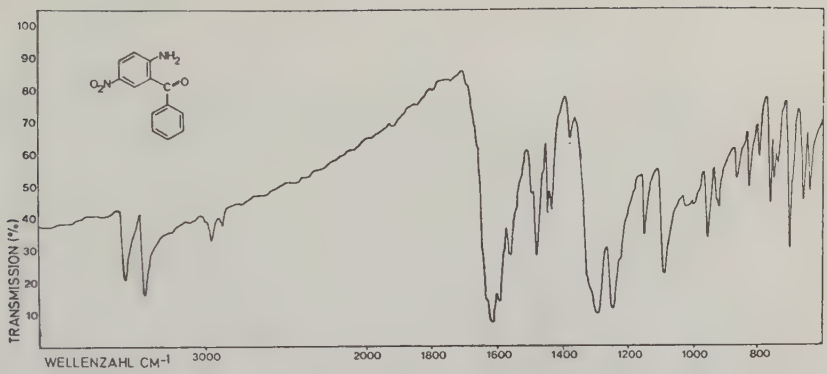


Abb.24: IR-Spektrum der gelben kristallinen Substanz

Im Vergleich zum IR-Spektrum des Nitrazepams (s.S.*90*) ist bei der gelben kristallinen Substanz das Signal der NO_2-Gruppe von 1330 cm^{-1} auf 1300 cm^{-1} erniedrigt, da es sich bei dem Molekül um ein durchkonjugiertes System handelt. Die Bande entsteht durch asymmetrische Valenzschwingung der NO-Bindung[25]. Das 2.Signal der NO_2-Gruppe zwischen 1500 cm^{-1} und 1570 cm^{-1} ist hier nicht mehr deutlich erkennbar.
Primäre Amine zeigen im Bereich zwischen 3300 cm^{-1} und 3500 cm^{-1} zwei Banden, eine unsymmetrische und eine symmetrische Valenzschwingung, die hier deutlich vorhanden sind.
Zwischen 1560 cm^{-1} und 1650 cm^{-1} erscheint nochmals eine NH-Deformationsschwingung der NH_2-Gruppe, die das CO-Signal überlagert und es gespreizt erscheinen läßt.

---

25) D.H.Williams, J.Fleming, Spektrosk.Methoden z. Strukturaufklärung, 3.Aufl., G.Thieme Verlag, Stuttgart, 1975, S.70.

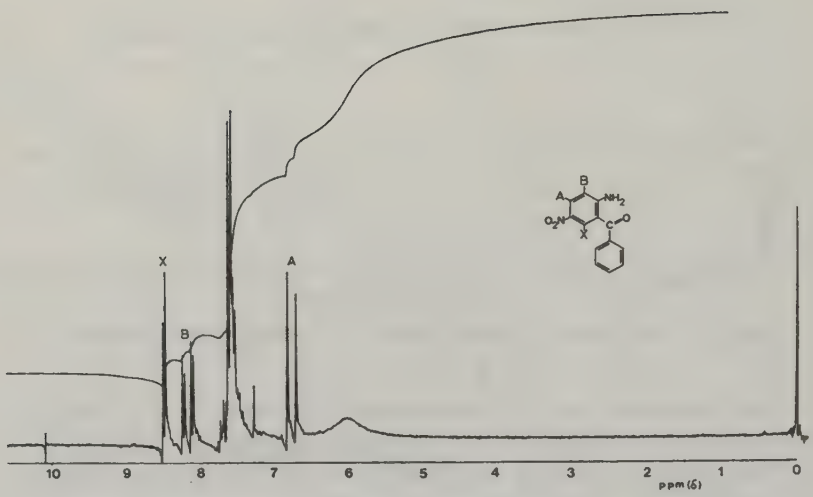


Abb.25: ^{1}H-NMR-Spektrum des Spaltproduktes nach saurer Hydrolyse des Nitrazepams.

Die Protonen des 2-Amino-5-nitro-benzophenons ergeben das Bild eines ABX-Systems. δ = 8,46 ppm (H_X), δ = 8,15 ppm (H_B), δ = 6,75 ppm (H_A). Durch die Abschirmung der benachbarten NH_2-Gruppe erscheint das Proton H_A ins hohe Feld verschoben. Bei 6 ppm erscheint die NH_2-Gruppe.

Die Lösung des Nitrazepams in Ethanol/$CaCl_2$-Lösung nahm nach Zusatz von Zn-Staub nach kurzem Stehenlassen Grünfärbung an, die nach dem Erwärmen und Abkühlen in Gelb überging. Dabei schied sich eine dunkelgelbe, amorphe Rohsubstanz ab, die nach dem Abfiltrieren in heißem Ethanol gelöst und nochmals heiß filtriert wurde. Nach dieser Trennung vom Zink fiel die gelbe Substanz nach Zugabe von Wasser und Abdampfen des Ethanols erneut aus. Die Substanz löste sich in geringer Menge in Ethanol 50%, und nach Zugabe von Natriumacetat, Benzoylchlorid und $FeCl_3$-Lösung entstand eine braunorange, undurchsichtige Lösung, die nach Zugabe von 3N-HCl eine klare, leuchtend gelbe Farbe zeigte. Ebenso verlief die Reaktion bei Durchführung mit dem Filtrat.

Um festzustellen, ob die Reaktion auch mit einer einfacheren analogen Substanz durchführbar ist, wurde p-Aminonitrophenol als Modellsubstanz eingesetzt. Hierbei trat am Schluß ebenfalls keine violette, sondern eine klare gelbe Farbe auf.

Die Reaktionsprodukte des Nitrazepams wurden danach dünnschichtchromatographisch untersucht.

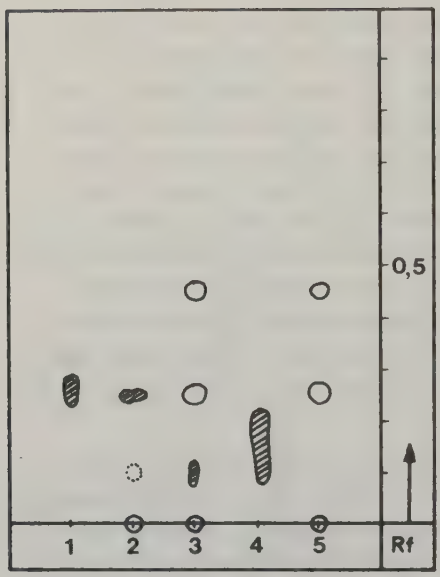


Abb.26:
Schematisches DC der Reaktionsprodukte nach Reduktion des Nitrazepams.

Fließmittel: Chloroform/ Diethylamin 9+1

Detektion: UV-Licht

● Fleck färbt sich an der Luft gelb.

1 = Nitrazepam
2 = Nitrazepam + Zn, $CaCl_2$-Lsg., kalt
3 = Nitrazepam + Zn, $CaCl_2$-Lsg., nach dem Erwärmen und Abkühlen
4 = Abfiltrierte gelbe Rohsubstanz
5 = Filtrat

Da die Lösung des Nitrazepams nach Zusatz von Zn-Staub und $CaCl_2$-Lösung in der Kälte zunächst Grünfärbung annahm, wurde in Position 2 des DC diese grüne Lösung aufgetragen. Die darüber auftretenden Flecke waren zwar nur schwach sichtbar, unterschieden sich aber nicht vom Rf-Wert des Nitrazepams (Punkt 1) und dem der gelben Rohsubstanz (Punkt 4). Die aus dem Filtrat (Punkt 5) hervorgegangenen Flecke vom Rf-Wert 0,25 und 0,45 sowie der auf dem Startpunkt zurückgebliebene Fleck fluoreszierten bei 366 nm rosa. Da der Fleck des gelben Rohproduktes im Gegensatz zu den anderen auf dem DC sehr langgezogen erscheint, ist unsicher, ob es sich um eine chemisch einheitliche Substanz handelt.

Deshalb wurde die dünnschichtchromatographische Prüfung mit anderen Fließmitteln angefertigt, wobei Salzbildung vermieden wurde.

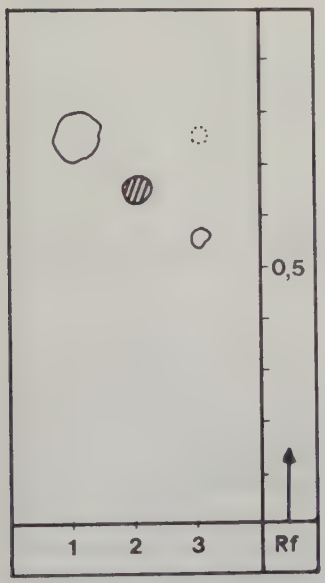


Abb.27:
Schematisches DC der Reaktionsprodukte nach Reduktion des Nitrazepams.

Fließmittel: Chloroform/ Methanol 9+1

Detektion: UV-Licht

● Fleck färbt sich an der Luft gelb.

1 = Nitrazepam
2 = Gelbe Substanz
3 = Filtrat

In Abb.27 ist die Schwanzbildung bei dem Fleck des gelben amorphen Rohproduktes vom Rf-Wert 0,65 nicht mehr vorhanden. Die Flecke aus dem Filtrat vom Rf-Wert 0,55 und 0,75 fluoreszieren beide schwach bei 366 nm. Der Fleck vom Rf-Wert 0,75 ist nur bei dieser Wellenlänge sichtbar.

Zur UV-spektrophotometrischen Messung wurde das gelbe amorphe Rohprodukt in siedendem Ethanol gelöst.

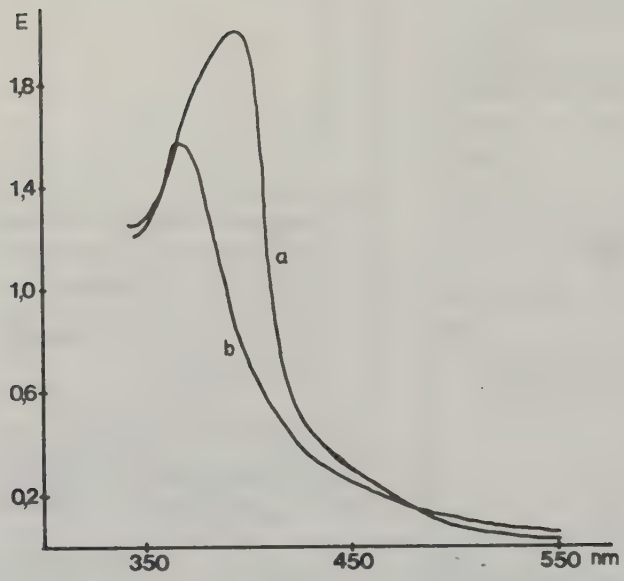


Abb.28: Elektronenspektren der Reduktionsprodukte des Nitrazepams
a) des gelben amorphen Rohproduktes
b) des Filtrates

Diese Lösung zeigte, auch nach dem Abkühlen, eine klare, tiefgelbe Farbe, die ein Absorptionsmaximum bei etwa 400 nm aufweist (Kurve a).
Das nach der Reduktion durch Abfiltrieren des gelben Produktes erhaltene Filtrat ist ebenfalls gelb, jedoch nicht so intensiv wie die zuvor hergestellte Substanzlösung. Die schwächer gelb gefärbte Lösung zeigt ein Absorptionsmaximum bei etwa 370 nm (Kurve b).
Wird die ethanolische Lösung des gelben Produktes stark verdünnt, so ist das Absorptionsmaximum bei 400 nm nicht

mehr vorhanden, und das neue Maximum liegt ebenfalls bei 370 nm.
Die Elementaranalyse des gelben amorphen Rohproduktes ergab nach Trocknung bei 100°C im Hochvakuum über P_2O_5 folgende Werte:

Gef.: C 70,2 H 4,45 N 16,4 O 8,4

$C_{30}H_{22}N_6O_2$ (498,6 Azoverbindung)
Ber.: C 72,2 H 4,45 N 16,8 O 6,4

$C_{30}H_{22}N_6O_3$ (514,6 Azoxyverbindung)
Ber.: C 70 H 4,3 N 16,3 O 9,3

$C_{30}H_{22}N_6O_{2,5}$ (506,6 Mischprodukt aus Azo-und Azoxyverbindung)
Ber.: C 71,1 H 4,4 N 16,6 O 7,9

Die aus verschiedenen Ansätzen erhaltenen gelben Rohprodukte weisen nur geringe Schwankungen bezüglich der elementaranalytischen Werte auf. Der für die reine Azoverbindung zu hohe Sauerstoffgehalt wird zahlenmäßig durch einen zu geringen Kohlenstoffanteil ausgeglichen. Da die Differenz der Molekulargewichte zwischen Azo- und Azoxyverbindung sehr gering ist, und die Entstehung einer einheitlichen Verbindung nicht gesichert ist, kann aus den Ergebnissen der Elementaranalyse keine eindeutige Aussage über das Vorliegen einer bestimmten Verbindung gemacht werden.

Die Elementaranalyse des durch Säulenchromatographie isolierten Hauptbestandteils des gelben Rohproduktes ergab folgende Werte:

Gef.: C 68,3 H 5,1 N 13,0 O 9,8

Sowohl für die Azo- wie für die Azoxyverbindung sind die Werte für Kohlenstoff und Stickstoff wesentlich zu niedrig, die für Wasserstoff und Sauerstoff zu hoch. Bei anderen Chargen betrug der Kohlenstoffanteil z.B. 71%. Auch hier führt das aus mehreren Ansätzen isolierte Produkt zu ab-

weichenden Ergebnissen, so daß eine eindeutige Identifizierung mit Hilfe der Elementaranalyse nicht möglich ist.

Isolierung des Hauptbestandteils des gelben amorphen Rohproduktes.

175 g Kieselgel, Korngröße 0,063-0,200 mm, wurden mit dem Fließmittel (Chloroform/Methanol 9,2+0,8) übergossen und blasenfrei in eine Säule (3,5 cm Weite, 50 cm Höhe) geschlämmt. Daraufhin wurden 20 mg gelbes Rohprodukt in wenig Fließmittelgemisch suspendiert, bis zur Entstehung einer klaren Lösung erwärmt und gleichmäßig auf den Säulenkopf gebracht. Beim Eluieren entstand eine breite gelbe Zone, die in einer Fraktion von 100 ml aufgefangen und dünnschichtchromatographisch untersucht wurde. Die so erhaltene Fraktion war auf dem DC einheitlich.

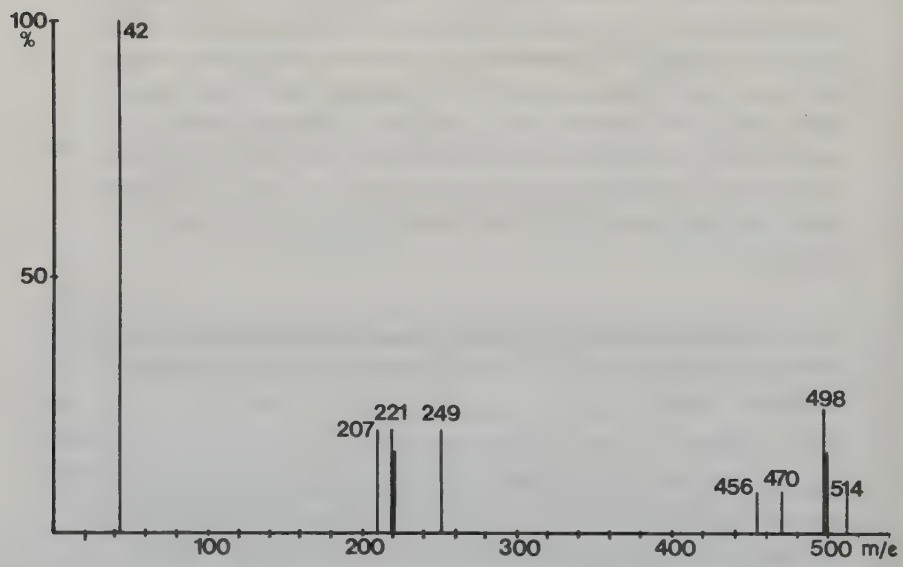
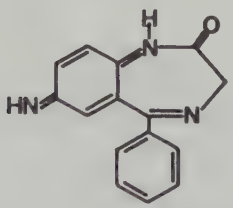


Abb.29: Massenspektrum des isolierten Hauptbestandteils (DC S.21 , Rf: 0,48) des gelben amorphen Rohproduktes Probe: 250°C.

Die Massenspektren des gelben amorphen Rohproduktes (S. 24) und dessen isolierten Hauptbestandteils wurden bei 235°C, 250°C und 270°C aufgenommen. Dabei erwiesen sich die Massenzahl des Molekülpeaks und ihre Intensität als temperaturabhängig.- Durch das allmähliche Aufheizen der Probe verdampfen zunächst bevorzugt die flüchtigeren Anteile. Das bedeutet im Bereich der niederen Masseneinheiten relativ hohe und im Bereich der hohen Masseneinheiten niedere Intensitäten der Peaks. Mit steigender Temperatur wird der Anteil der weniger flüchtigen Komponenten erhöht, was eine Zunahme der Intensität der entsprechenden Peaks zur Folge hat[26].
Bei einer Probentemperatur von 235°C tritt der Molekülpeak bei m/e 249 auf, und man kann die Entstehung eines monomeren Reaktionsproduktes für wahrscheinlich halten, dem folgende Struktur zukommen könnte:



p-CHINONDIIMINDERIVAT
MG 249

---

26) Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie 10/3, 4.Aufl., 752, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1965

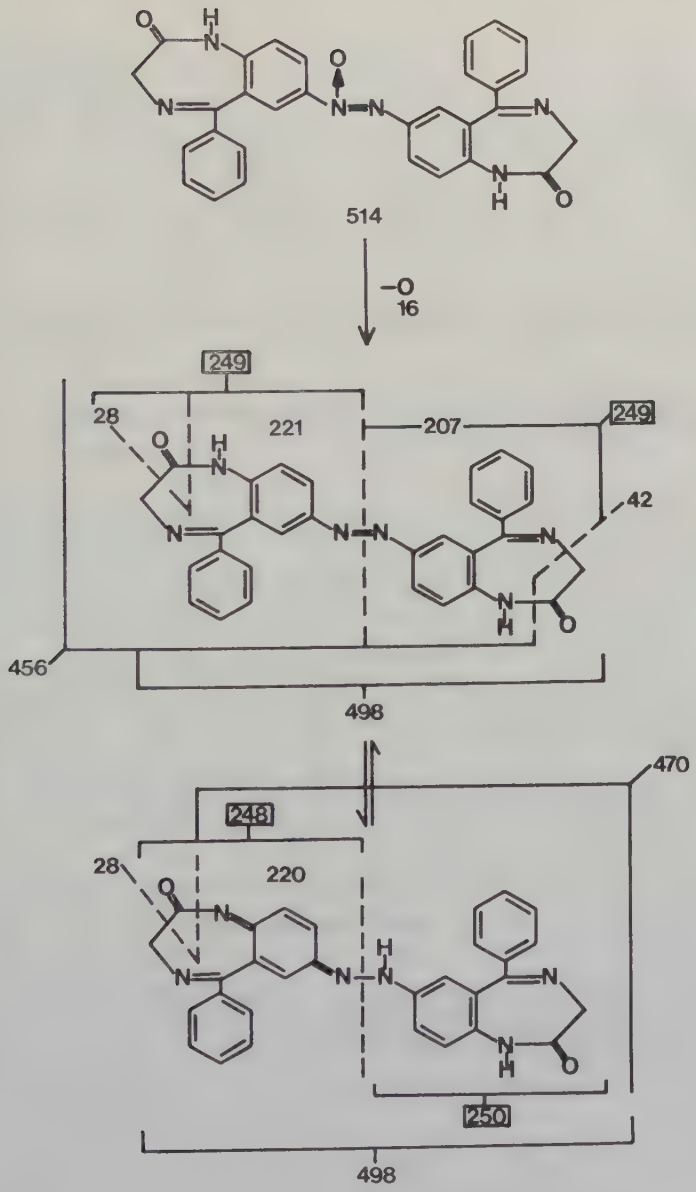
Bei einer Temperaturerhöhung auf 250°C und darüber erscheinen dann weitere Peaks bei höheren Masseneinheiten. Es wäre auch denkbar, daß ein Oxim als unlösliche Verbindung ausfällt, da Oxime gut kristallisierende amphotere Verbindungen sind, die bei pH 7 gut zu erhalten sein müßten.- Ein zum Oxim reduziertes Produkt hätte ein Molekulargewicht von 265, das aber im Massenspektrum nicht in nennenswerter Menge nachzuweisen ist. Daraus folgt weiterhin, daß die Spaltung der Azoxyverbindung ausschließlich über die Azoverbindung läuft.

Aromatische Verbindungen mit einer Carbonylfunktion als Bestandteil eines konjugierten Systems sind durch intensive Spitzen bei M-28 gekennzeichnet, was der Abspaltung eines Moleküls CO entspricht (m/e 221, m/e 470)[27]. Die Verminderung um weitere 27 Masseneinheiten kann den Verlust von HCN kennzeichnen (m/e 193). Der Bruchteil mit der größten relativen Intensität liegt bei m/e 42, was der Abspaltung der Struktur CH_2CO zukommt. Der weitere Zerfall des Moleküls kann nur angedeutet werden.

---

27) H.Kienitz, Massenspektrometrie, 472, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße, 1968

Zerfallsschema



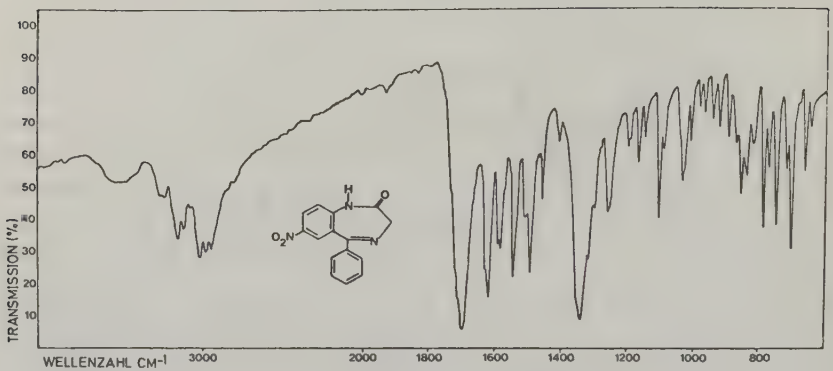


Abb.30: IR-Spektrum des Nitrazepams, gemessen in wasserfreiem Kaliumbromid.

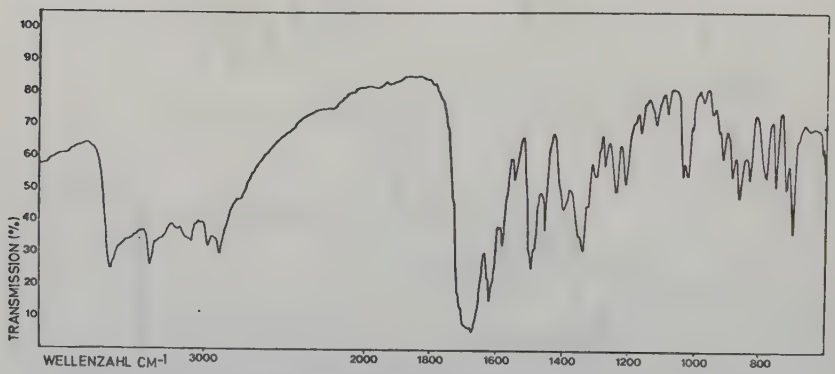


Abb.31: IR-Spektrum des amorphen Rohproduktes, gemessen in wasserfreiem Kaliumbromid.

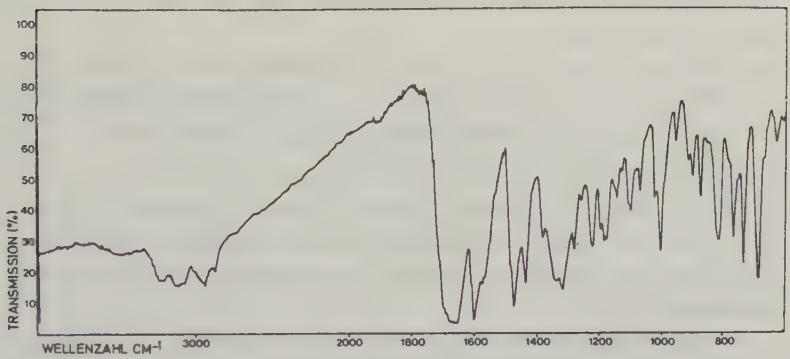


Abb.32: IR-Spektrum des Hauptbestandteils des gelben amorphen Rohproduktes, gemessen in wasserfreiem Kaliumbromid.

Das IR-Spektrum des Nitrazepams (Abb.30) läßt zwischen 2900 cm^{-1} und 3300 cm^{-1} zwei charakteristische Valenzschwingungen erkennen: zwischen 3050 cm^{-1} und 3300 cm^{-1} ein typisches Paar von Amidbanden und zwischen 2850 cm^{-1} und 3000 cm^{-1} eine Bande von gesättigtem CH_2. Bei 1700 cm^{-1} erscheint die starke und scharfe Carbonylbande und bei 1330 cm^{-1} und 1540 cm^{-1} die ebenfalls stark ausgeprägte NO_2-Gruppe.

Im IR-Spektrum des gelben amorphen Rohproduktes (Abb.31) ist eine Veränderung im Wellenzahlenbereich oberhalb von 3000 cm^{-1} sichtbar. Das bei 3300 cm^{-1} auftretende Signal kann einem in Lactamstruktur vorliegenden sekundären Amid zugeordnet werden. Auffällig ist weiterhin das Vorhandensein einer mittelstarken Bande bei 3600 cm^{-1}, die einer OH-Gruppe zuzuordnen ist, und die nochmals zwischen 1300 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} auftritt. Da das Molekül aber keine freie OH-Gruppe besitzt, kann man vermuten, daß die vorhandene Carbonylfunktion z.T. in der Enol-Form vorliegt.- Die Signale

der NO_2-Gruppe fehlen. Weiterhin stark ausgeprägt ist die CO-Bande, die durch Überlagerung von CN- und NH-Schwingungen stark gespreizt ist.
Die Azogruppierung -N=N- tritt, allgemein sehr schwach sichtbar, bei 1575 cm^{-1} auf. Eine in der Substanz enthaltene aliphatische Azoxygruppe $-\overset{O}{\overset{|}{N}}=N-$ müßte eine sehr starke Bande zwischen 950 cm^{-1} und 970 cm^{-1} geben. Sowohl in Abb.21 als auch in Abb.22 ist ein solches Signal nicht zu erkennen, was als weiterer Hinweis darauf dient, daß das gelbe Rohprodukt hauptsächlich aus der Azoverbindung besteht.
Im IR-Spektum des durch Säulenchromatographie isolierten Hauptbestandteils (Abb.32) treten unterhalb der Wellenzahl von 1700 cm^{-1} keinerlei Unterschiede zum IR-Spektrum des gelben Rohproduktes auf. Bei Wellenzahlen oberhalb von 3000 cm^{-1} war auch nach mehrmaligen Versuchen kein besseres Spektrum zu erhalten, so daß hier nur schwer eine Aussage über Veränderungen gemacht werden kann.

Die Azoxyverbindung vom Molekulargewicht 514 wurde hergestellt, indem eine stark konzentrierte ethanolische Lösung von Nitrazepam mit wenig Zinkstaub versetzt und etwa fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen wurde. Die schwach gelb gefärbte, klare Lösung wurde in Wasser gegossen, wobei ein flockiger Niederschlag der hellgelben Azoxyverbindung ausfiel. Das Produkt war vollständig ethanollöslich. Die Identität des Produktes wurde durch das Massenspektrum bestätigt.

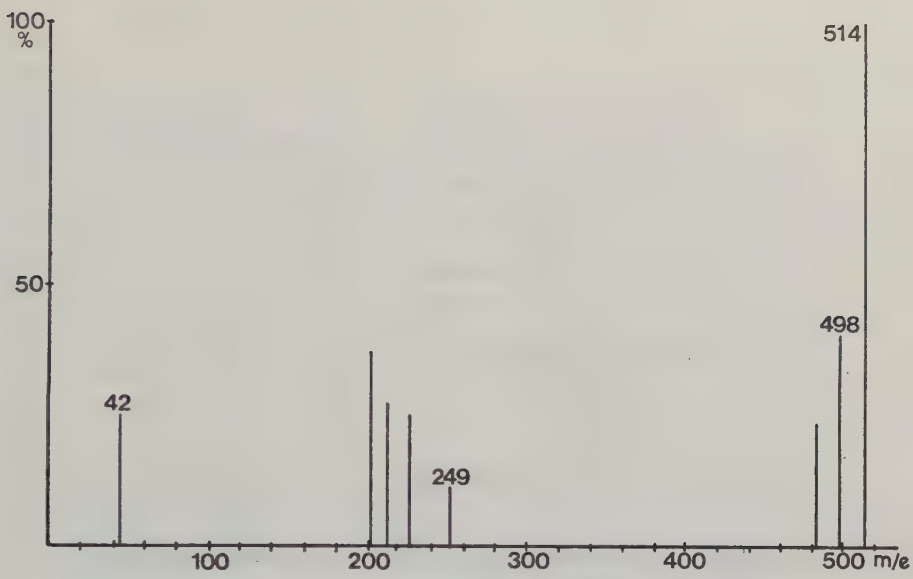


Abb.33: Massenspektrum der Azoxyverbindung

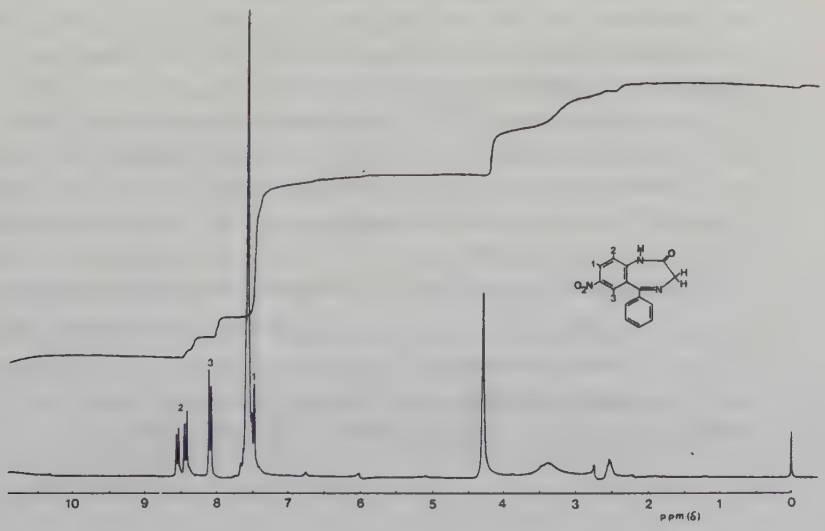


Abb.34: ^{1}H-NMR-Spektrum des Nitrazepams

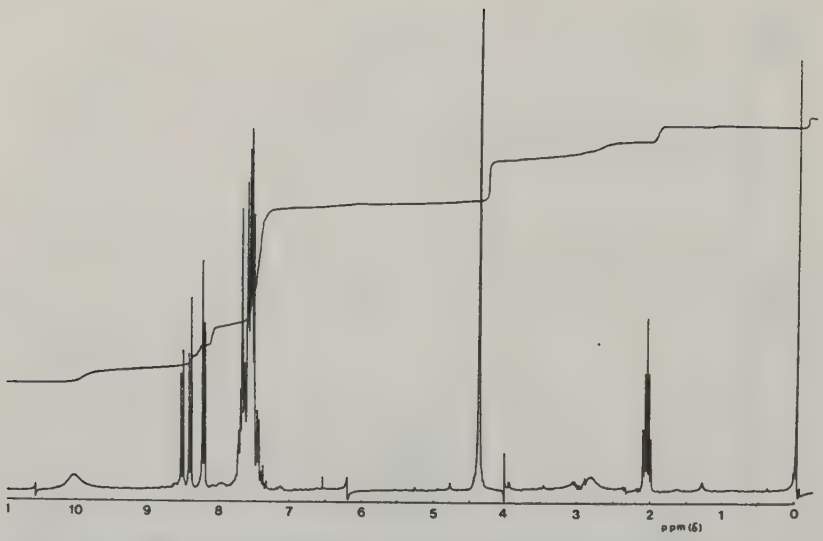


Abb.35: ^{1}H-NMR-Spektrum der Azoxyverbindung aus zwei Molekülen Nitrazepam

Vergleicht man die ^{1}H-NMR-Spektren des Nitrazepams (Abb.34) und der Azoxyverbindung aus zwei Molekülen des reduzierten Nitrazepams (Abb.35), so ergeben sich zwei fast identische Abbildungen. Die drei Protonen des an den Diazepinring ankondensierten Benzols rufen folgende Signale hervor: H_3 gibt ein Dublett bei δ = 8,08 ppm; H_2, das eine ortho- und eine meta-Kopplung aufweist, ergibt ein Doppel-Dublett bei δ = 8,48 ppm und H_1 ein Dublett bei δ = 7,46 ppm. Die Protonen des Aromaten erscheinen bei δ = 7,54 ppm, die $-CH_2-$ Gruppe gibt ein Singulett bei δ = 4,29 ppm, und bei δ = 3,39 ppm erscheint die NH-Gruppe des Diazepinringes.

In der Abbildung der Azoxyverbindung kommen dieselben Signale mit etwas verschobenen ppm-Werten. Durch Überlagerung der Protonen von zwei Benzolringen im Molekül kommt es zu stärkerer Aufspaltung im ppm-Bereich des Benzols.

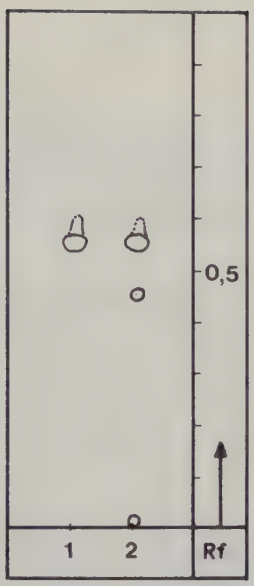


Abb.36:
Schematisches DC des Nitrofurantoins und des mit $Zn/CaCl_2$ umgesetzten Nitrofurantoins.

Fließmittel: Chloroform/ Ethanol 9+1

Detektion: UV-Licht

1 = Nitrofurantoin
2 = Mit $Zn/CaCl_2$ reduziertes Nitrofurantoin

Das Dünnschichtchromatogramm zeigt nach der Reduktion (Punkt 2) einen Hauptfleck vom gleichen Rf-Wert (0,55) wie Nitrofurantoin. Außerdem sind noch schwach sichtbar zwei kleine Flecke von Umsetzungs- bzw. Spaltprodukten. In anderen Fließmittelgemischen[28)29)] gelang keine Auftrennung der Reaktionsprodukte über Punkt 2. Das durch Säulenchromatographie isolierte Hauptprodukt nach der Reduktion ergab im Massenspektrum denselben Molekülpeak wie Nitrofurantoin.
Damit ist gezeigt, daß sich bei der Reduktion kaum etwas von der Substanz umsetzt.

---

28) Bertoletti B.; Perlotto F.: Farmaco, Ed.Prat. 23, 371(1968), Ref.C.A. 69, 56891(1968)
29) Gerlach H.: Pharmaz. Zentralhalle Deutschland 105, 771(1966)

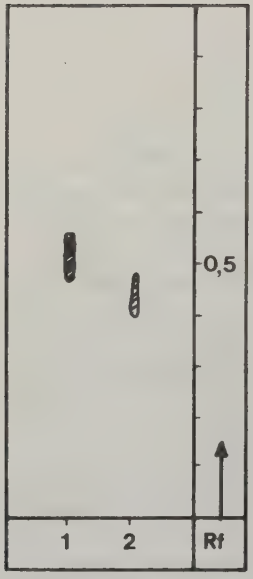


Abb.37:
Schematisches DC des Nitrofurantoins und des mit $Zn/CaCl_2$ reduzierten Nitrofurantoins.

Fließmittel: Aceton/Methanol/Diethylamin 90+5+10

Detektion: UV-Licht

● Fleck färbt sich an der Luft gelb.

1 = Nitrofurantoin
2 = Mit $Zn/CaCl_2$ reduziertes Nitrofurantoin

Wie Abb.37 zeigt, gelang in dem Fließmittel keine Auftrennung des Reduktionsproduktes. Da der Rf-Wert des Produktes über Punkt 2 niedriger lag als der des Nitrofurantoins, konnte hieraus auch nicht abgeleitet werden, ob es sich überhaupt um ein einheitliches Produkt handelt.

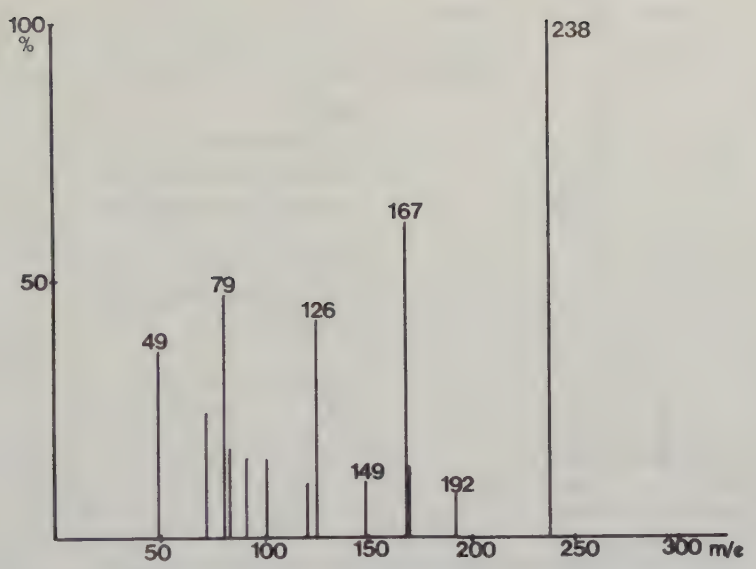


Abb.38: Massenspektrum des nach der Reduktion des Nitrofurantoins entstandenen Hauptproduktes; es handelt sich um Nitrofurantoin selbst.

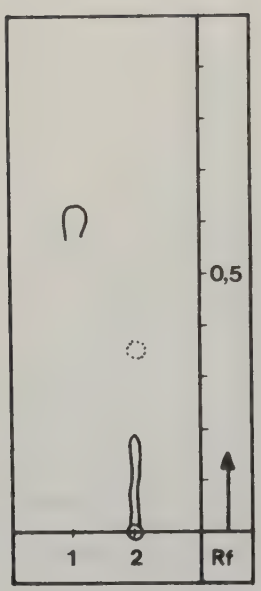


Abb.39:
Schematisches DC der Reduktionsprodukte nach Reduktion des Metronidazols.

Fließmittel[30]: Benzol/ Aceton/Ammoniak (25%) 20+75+5

Detektion: UV-Licht

1 = Metronidazol
2 = Reaktionsprodukte nach Reduktion des Metronidazols

Das für Nitroimidazolderivate empfohlene Fließmittel Benzol/ Aceton/Ammoniak 20+75+5 brachte für Metronidazol keine gute Auftrennung.
Wurde die Reduktion des Metronidazols mit Zink in Gegenwart von Ammoniumchlorid statt Calciumchlorid durchgeführt, entstanden Produkte mit den gleichen Rf-Werten. Der Fleck des Hauptproduktes war jedoch schwächer sichtbar, und die Entstehung der fluoreszierenden Bestandteile schien hier begünstigt zu sein.
Wird die Reduktion ohne Zusatz von Ethanol durchgeführt, so zeigt das DC ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede gegenüber dem DC der Standardreaktion. Nur der Fleck vom Rf-Wert 0,5 tritt stärker hervor.

---

30) Goenecha,S.: J.Chromatogr.(Amsterdam) 36(1968) 375.

Zur UV-spektrophotometrischen Messung wurden die Kurven des Metronidazols (Abb.40) und der roten Reaktionslösung (Abb.41 a) sowie des isolierten Hauptproduktes (Abb.41 b) dieser Lösung aufgenommen. Zum Vergleich wurde das Spektrum des Histidins abgebildet (Abb.42).

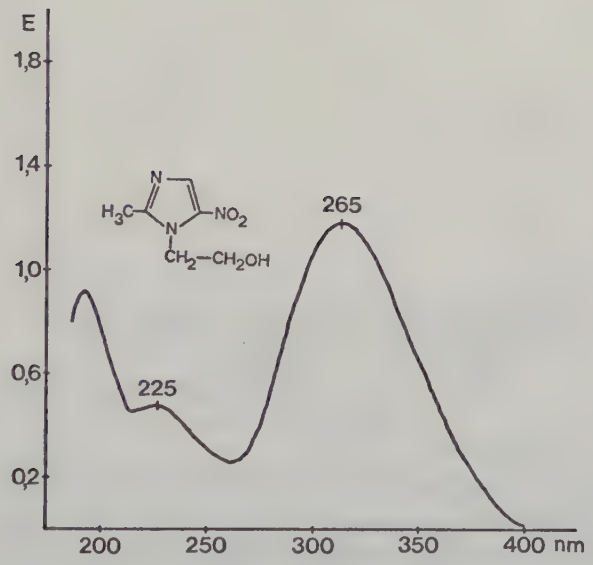


Abb.40: Elektronenspektrum des Metronidazols
c = 2 mg/10 ml Lösung

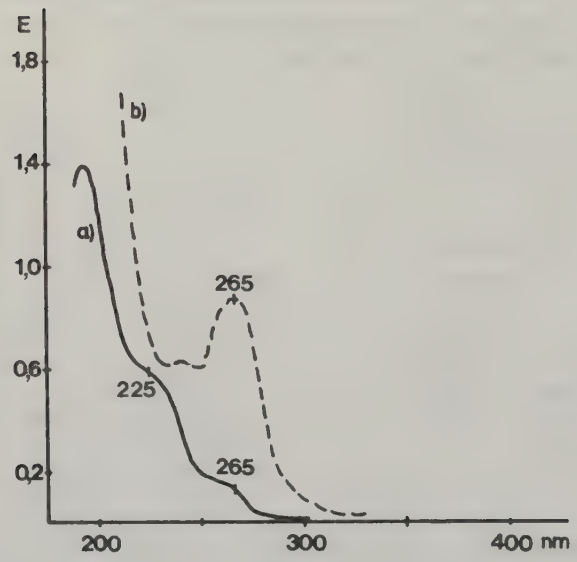


Abb.41: Elektronenspektren
a) der roten Reaktionslösung nach Reduktion des Metronidazols
b) des daraus isolierten Hauptproduktes

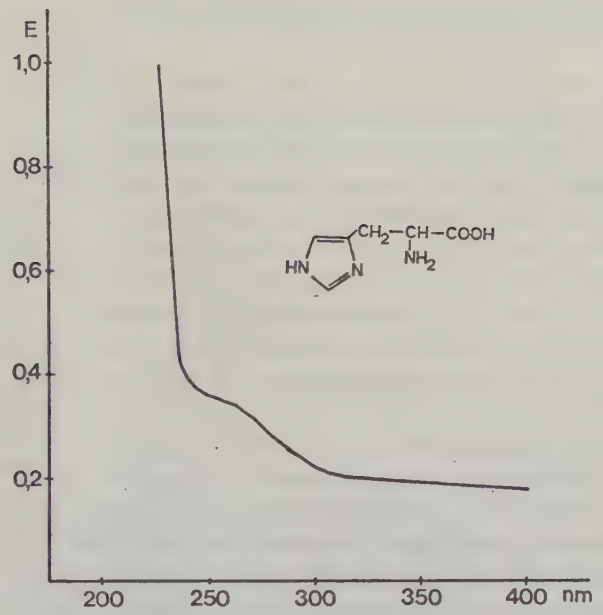


Abb.42: Elektronenspektrum des Histidins
c = 4 mg/10 ml Lösung

Die Absorption des Imidazol-Ringes liegt bei 250 nm und besitzt sehr geringe Intensität. Funktionelle Gruppen erhöhen die Wellenlänge und intensivieren sie[31]. Das unsubstituierte Histidin (Abb.42) weist eine Schulter bei etwa 260 nm auf. Metronidazol besitzt ein starkes Absorptionsmaximum bei 315 nm und ein schwaches bei 225 nm.
Die rote Reaktionslösung nach Reduktion des Metronidazols (Abb.41 a) weist je eine Schulter bei 225 nm und 265 nm auf. Das isolierte Hauptprodukt besitzt bei 265 nm ein starkes und bei 240 nm noch ein geringes Absorptionsmaximum.

---

31) C.N.R.Rao, Ultra-Violett and visible Spectroscopy, 52, Butterworth + Co, London 1961

Isolierung des Hauptproduktes nach der Reduktion des Metronidazols (Abb.11, S.32 , Rf-Wert: 0,6)

175 g Kieselgel, Korngröße 0,063-0,200 mm, wurden mit dem Fließmittel (Chloroform/Methanol 7+3) übergossen und blasenfrei in eine Säule (3,5 cm lichte Weite, 50 cm Höhe) geschlämmt. Die rote wäßrige Lösung, die nach Durchführung der Reaktion bei Verwendung von 200 mg Substanz entstanden war, wurde am Rotationsverdampfer weitestgehend eingeengt und in wenig Methanol aufgenommen. Diese Lösung wurde auf den Säulenkopf gebracht und mit dem Fließmittel eluiert. Nach dem Ablaufen der ersten 300 ml konnten 6-8 Fraktionen zu je 50 ml aufgefangen werden.
Das Eluat zeigte auf dem DC nur einen Fleck, jedoch ergab die Elementaranalyse, daß das Produkt eine grössere Menge chloridhaltiger Verunreinigungen enthielt. Durch Eindampfen des Fließmittels und Lösen des Rückstandes in Chloroform konnte er weitgehend davon befreit werden. Wurde die Chloroformphase nochmals zur Trockne eingeengt und das Produkt in Ether aufgenommen, konnte es daraus kristallin gewonnen werden. Die Ausbeute betrug ca. 3 mg.

Elementaranalyse :

Metronidazol

$C_6H_9N_3O_3$ (171) Ber.: C 42,1 H 5,3 N 24,5 O 28

Gef.: C 42,5 H 5,3 N 24,6 O 27,7

Isoliertes Hauptprodukt:

Gef.: C 51,2 H 7,3 N 17,8 O 15,6

Chlorid: 0,6

Zn+Ca : ppm-Bereich

Durch den geringen Gehalt an Zink und Calcium konnte die Entstehung einer Komplexverbindung ausgeschlossen werden.

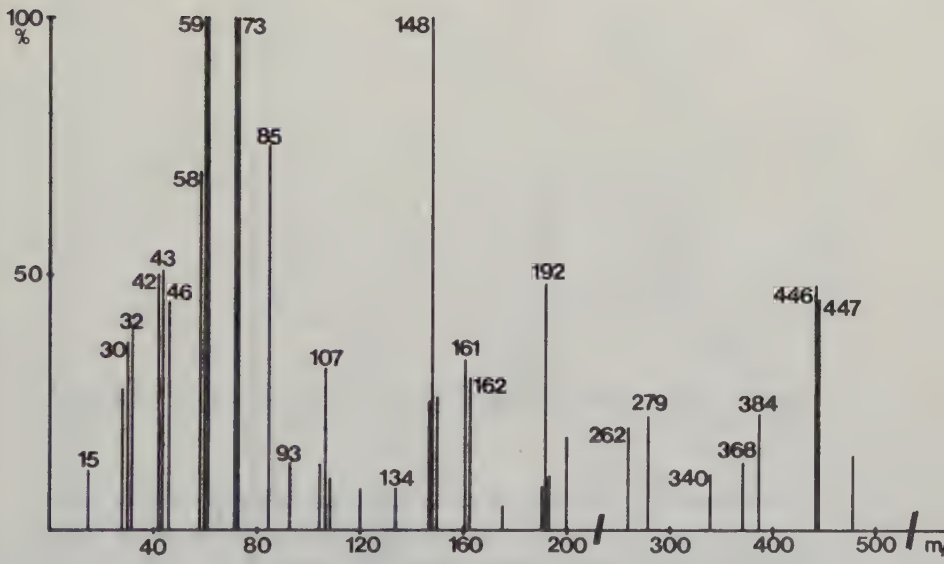


Abb.43: Massenspektrum des Hauptproduktes der Reduktion des Metronidazols.

Es war sehr schwierig, ein brauchbares Massenspektrum zu erhalten. Bei der Aufnahme des Spektrums der durch Chloride verunreinigten Substanz schien der Molekülpeak der Peak bei m/e 192 zu sein. Bis hierher gleicht auch das Felddesorptionsspektrum dem Massenspektrum in allen wesentlichen Peaks. Da es zumindest ein Schlüsselbruchstück darstellt, wurde mit Hilfe der Ergebnisse der Elementaranalyse versucht, eine Struktur zu ermitteln.

Auf m/e 192 entfallen jedoch 2,5 N-Atome, so daß eine genaue Struktur nicht angegeben werden konnte.
m/e 384 = 2 x 192
m/e 447 = 3 x 149
Im unteren Bereich ist das Auftreten einer Serie zu erkennen.

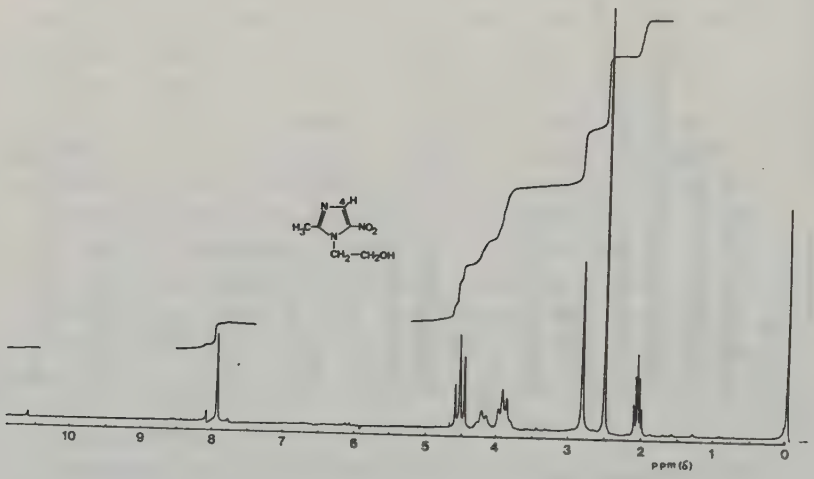


Abb.44: ^{1}H-NMR-Spektrum des Metronidazols

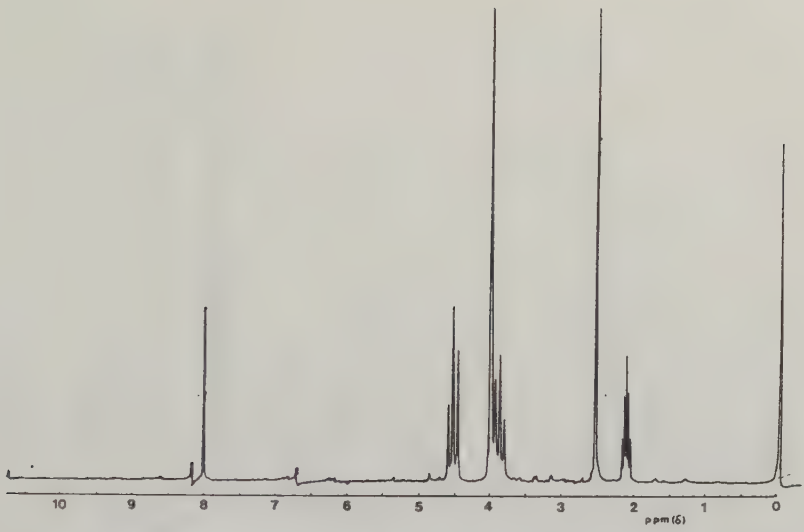


Abb.45: ^{1}H-NMR-Spektrum des Metronidazols, ausgeschüttelt mit D_2O.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum des Metronidazols (Abb.44) erscheint bei 2,43 ppm die Methylgruppe als Singulett, bei 3,92 ppm und 4,55 ppm die beiden CH_2-Gruppen des aliphatischen Alkohols als Triplett und dazwischen bei 4,26 ppm koppelt die alkoholische OH-Gruppe mit der benachbarten CH_2-Gruppe zum Triplett, das beim Ausschütteln mit D_2O verschwindet (Abb.45). Bei 7,94 ppm ist das H-Atom an C_4 sichtbar. Das Auftreten von Protonensignalen, die durch Kopplung mit alkoholischen OH-Gruppen entstehen, sind nur bei ganz reinen Substanzen möglich.

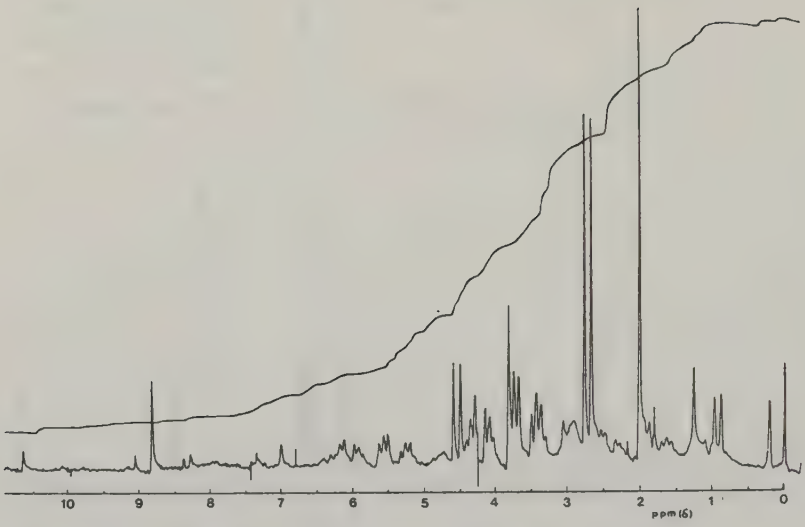


Abb.46: ^{1}H-NMR-Spektrum des isolierten Hauptproduktes nach der Reduktion des Metronidazols.

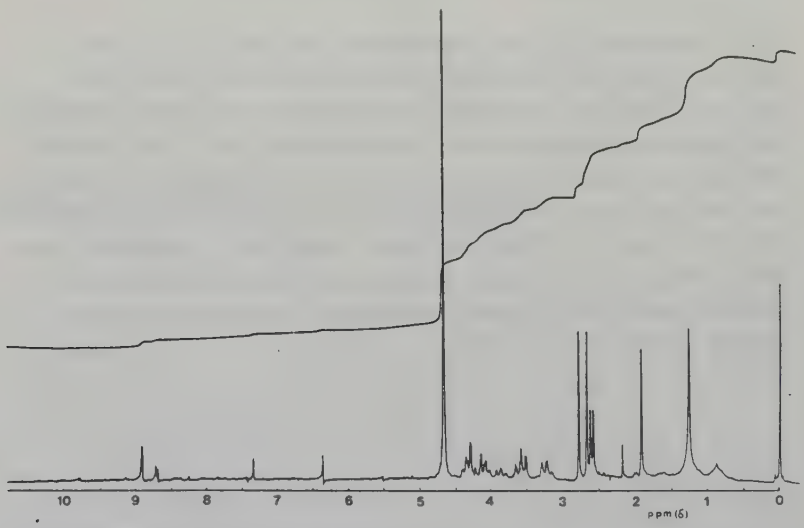


Abb.47: ^{1}H-NMR-Spektrum des isolierten Hauptproduktes nach der Reduktion des Metronidazols, mit D_2O ausgeschüttelt.

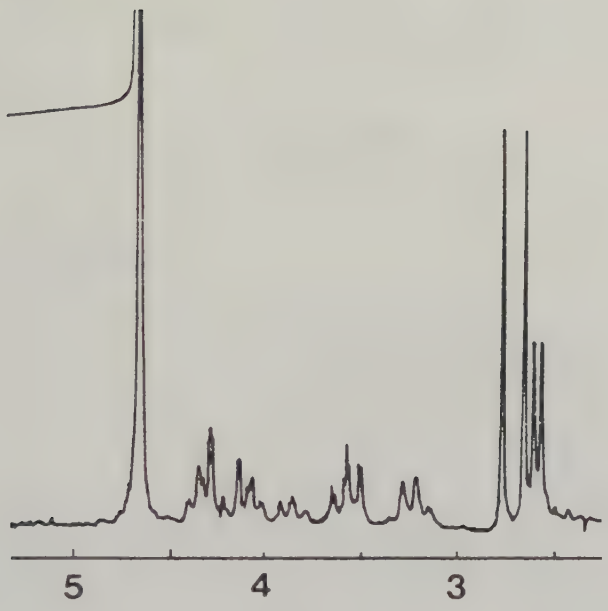


Abb.47 a: Ausschnittvergrößerung der Abb.47 von 2,5 ppm-4,5 ppm.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum des isolierten Hauptproduktes nach der Reduktion des Metronidazols (Abb.46) können die beiden Signale bei 2,69 ppm und 2,76 ppm als zwei Singuletts chemisch äquivalenter Methylgruppen interpretiert werden. Das Auftreten zweier Singuletts aus methylsubstituierten dimeren Oximen ist anhand zahlreicher Beispiele von Unterhalt et.al. beschrieben worden[32].
Als weitere Doppelsinguletts sind die Signale bei 0,91 ppm/1,0 ppm und die Signale bei 4,53 ppm/4,61 ppm anzusehen. Im ^{1}H-NMR-Spektrum des mit D_2O ausgeschüttelten Produktes (Abb.47) sind die beiden letztgenannten Doppelsinguletts nicht mehr vorhanden. Dafür erscheint bei 2,62 ppm/2,67 ppm ein neues Doppelsingulett. Oberhalb 4,6 ppm fehlen die

32) Ulf Pindur, Dissertation Marburg/Lahn, 1974

Signale ganzer Gruppen. Auffällig ist weiterhin, daß die Signale zwischen 3,18 ppm und 4,43 ppm hier nochmals aufgespalten sind (Abb.47 a).

Lebenslauf

Name:	Astrid-Silvia Beinroth
Geburtstag:	25.April 1951
Geburtsort:	Celle
Eltern:	Wilhelm Beinroth und Friedel Beinroth geb. Lucas
Beruf des Vaters:	Oberstlt. a.D. Ing.-(grad.)

Schulischer Werdegang:

Grundschulen:	Waldwegschule Celle April 1957 bis November 1958 Allmersschule Bremerhaven November 1958 bis März 1961
Gymnasien:	Wilhelm-Raabe-Schule Bremerhaven April 1961 bis Juli 1964 Gynmasium an der Kirchheide bzw. Gymnasium Lesum Bremen Juli 1964 bis Mai 1969
Reifeprüfung:	16. Mai 1969

Beruflicher Werdegang:

Apothekenpraktikum:	Schiller-Apotheke Bremen-Blumenthal, 1.Oktober 1969 bis 31. September 1971
Pharmaz.Vorprüfung:	9. September 1971 in Bremen
Apothekentätigkeit:	Oktober 1971 bis September 1973 in Bremen
Studium:	Universität Erlangen WS 1973/74 bis November (Chemie-Ingenieurwesen) Universität Kiel WS 1973/74 von November bis SS 1977
1.Abschnitt der Pharmazeut.Prüfung:	30. September 1975

2.Abschnitt der Pharmazeut.Prüfung:	13.Juni 1977
Beginn der vorliegenden Arbeit:	Oktober 1977 unter der Leitung von Herrn Professor Dr.H. Auterhoff am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen
Abschluß der Arbeit:	April 1980
Wiss.Hilfskraft:	1.Dezember 1977 bis 31. September 1979
Wiss.Angestellte:	1. Oktober 1979

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr. H.Auterhoff waren die Herren Professoren und Dozenten:

O.-E.Schultz, J.Schnekenburger, G.Blaschke
F.Neuwald (Pharmazie)
F.Amelunxen, D.Frohne, P.Pohl (Pharmazeut.Biologie)
H.Lüllmann, A.Ziegler (Pharmakologie)
A.Mondon (Chemie)
F.Karstensen (Physik)
W.Müller-Ruchholtz (Hygiene)

ifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/64321